



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE FOCOS DE BRUCELOSE BOVINA NA DIV DE
ELVAS, REGIÃO DO ALENTEJO, NO ÂMBITO DO PLANO DE ERRADICAÇÃO DA
DOENÇA

ANDRÉ FILIPE ELIAS DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Professor Doutor Virgílio Almeida

Professora Doutora Yolanda Maria Vaz
Professor Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

ORIENTADOR

Professor Doutor Fernando Jorge
Silvano Boinas

2011

LISBOA

Agradecimentos

Ao meu orientador, o Professor Doutor Fernando Boinas, pela disponibilidade, sabedoria e imaginação ímpares que sempre demonstrou...

Ao Eng.º Hugo Martins, pela disponibilidade e preciosa ajuda na elaboração dos mapas e, principalmente, pela alegria e entusiasmo com que o fez...

Ao pessoal (uns ainda por lá, outros nem por isso...) da DIV de Elvas: aos veterinários Dr. João Paulo Sousa, Dr. Manuel Abreu, Dra. Fátima Encarnação e Dr. José Maria Cardoso, pelos ensinamentos transmitidos e, fundamentalmente, pela paciência de me aturarem; ao pessoal administrativo, à D. Cila, à D. Carmita, à Cláudia e à D. Clotilde, pela grande simpatia e disponibilidade para me ajudar; aos funcionários de campo, o Sr. Nuno Nogueira, o Sr. Brás Silva, Sr. José Henriques e o Sr. João Luís, especialmente pela boa disposição com que encaram cada novo dia de trabalho e disponibilidade ímpares; ao pessoal do laboratório, a Eng.^a Joana e a D. Lúcia...

À Directora de Serviços da Região Alentejo, a Dra. Maria do Carmo Caetano, pela oportunidade concedida...

A todos os produtores, funcionários, veterinários (em particular ao Dr. José Guerra) e auxiliares que tornaram a execução desta dissertação possível...

À minha família, em especial pai e mãe, pelo “paitrocínio”, mas também, ao meu irmão, aos meus avós, tios e primos...

À minha namorada... Obrigado Rita pela compreensão, paciência, carinho e muito amor...

Aos amigos e amigas que não vou nomear, mas que os próprios sabem quem são, com quem não pude partilhar mais tempo devido à distância...

... A todos eles e a cada um, o meu MUITÍSSIMO OBRIGADO!

RESUMO

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE UMA CAMPANHA DE VACINAÇÃO CONTRA A BRUCELOSE BOVINA NA REGIÃO DO ALENTEJO COM A VACINA RB51

A Brucelose Bovina (BB) é uma doença bacteriana dos bovinos causada por *Brucella abortus*, menos frequentemente por *B. melitensis* e ocasionalmente por *B. suis*, podendo causar doença em humanos. É uma doença de declaração obrigatória com distribuição mundial, responsável por elevadas perdas económicas nos países, como Portugal, em que é endémica.

Clinicamente é caracterizada por um ou mais dos seguintes sinais clínicos: aborto no último terço da gestação, retenção placentária, orquite, epididimite e, raramente, artrite. A infecção pode ocorrer *in utero* para a descendência ou pelo contacto com secreções e excreções de animais infectados, apresentando altos índices de infecciosidade e resistência no meio ambiente.

O diagnóstico clínico não permite a confirmação da infecção sendo para isso necessário recorrer ao diagnóstico laboratorial. Para rastreio da infecção geralmente é usada serologia utilizando os testes do Rosa Bengala (RB), da Fixação do Complemento (FC) ou o ELISA ou testes no leite como o Teste do Anel ou mesmo o ELISA. Também existem testes alérgicos como a Brucelina por via intradérmica.

O isolamento laboratorial da *Brucella spp* a partir de materiais infectados é a prova laboratorial definitiva para confirmação da infecção mas pode apresentar uma sensibilidade baixa. Após a identificação da espécie de *Brucella* ela deve ser caracterizada em termos de biovariedade. Mais recentemente, tem sido implementado o uso de PCR quer como complemento ao isolamento de *Brucella spp* quer como método de biotipificação baseada em sequências genómicas específicas.

Esta doença tem sido erradicada de diversos países utilizando medidas médicas e sanitárias implementadas no âmbito de programas oficiais de erradicação. Em Portugal existe um plano de Erradicação co-financiado pela União Europeia que é coordenado pela Direcção Geral de Veterinária e implementado no terreno pelas Organizações de Produtores Pecuários. Este plano é baseado na testagem periódica dos efectivos e no abate dos animais positivos assim como no controlo de movimentos de animais entre explorações. Complementarmente, tem sido implementada em anos recentes, a vacinação com RB51 dos efectivos das unidades epidemiológicas.

Neste trabalho é apresentada uma avaliação epidemiológica inicial de uma campanha de vacinação de um efectivo total de cerca de 2000 animais, de 7 explorações do Alto Alentejo infectadas com *Brucella spp* em que foi implementado um programa de vacinação em massa com RB51.

Palavras-chave: Brucelose Bovina, vacinas, RB51, avaliação epidemiológica, Alentejo.

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF A VACCINATION CAMPAIGN AGAINST BOVINE BRUCELLOSIS IN THE REGION OF ALENTEJO WITH THE RB51 VACCINE

Bovine Brucellosis (BB) is a bacterial disease of cattle caused by *Brucella abortus*, less frequently by *B. melitensis* and occasionally by *B. suis*, which can cause disease in humans. It is a notifiable disease with worldwide distribution, responsible for economic losses in countries such as Portugal, where it is endemic.

Clinically it is characterized by one or more of the following clinical signs: abortion in the last third of gestation, retained placenta, orchitis, epididymitis and, rarely, arthritis.

Infection can occur to offspring *in utero* or by contact with secretions and excretions of infected animals, with high rates of infectivity and resistance in the environment.

The clinical diagnosis does not allow the confirmation of the infection, being necessary to use the laboratory diagnosis. To track the infection, serology tests are often used. Is common the use of the Rose Bengal (RB), Complement Fixation (CF) or ELISA tests. Milk testing using the Milk Ring Test or milk ELISA is an option. There are also allergy tests as intradermal brucellin.

The laboratory isolation of *Brucella spp* from infected materials is the definitive laboratory test to confirm infection but may have a low sensitivity. After identification of *Brucella* she should be characterized in biovar. More recently it has been implemented the using of PCR as a complement to the isolation of *Brucella spp* or as a biotyping method based on specific genomic sequences.

This disease has been eradicated from many countries using medical and health measures implemented as part of the official eradication programs. In Portugal there is a plan for Eradication of BB, co-financed by the European Union, which is coordinated by the Veterinary National Authority and implemented on the ground by Livestock Producers Organisations. This plan is based on regular testing of herds and culling of positive animals as well as on the control of animal movements between farms. In addition, it has been implemented in recent years, the vaccination with RB51 of bovines from specific epidemiological units.

This thesis presents an initial epidemiological assessment of a vaccination campaign in the Alto Alentejo of a total of about 2,000 animals within seven farms infected with brucellosis, in which was implemented a program of vaccination with RB51.

Keywords: Bovine Brucellosis, vaccines, RB51, epidemiological assessment, Alentejo.

INDICE

Agradecimentos.....	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objectivos relacionados com o Programa de Vacinação.....	1
1.2 Outras actividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular	2
1.3 Competências adquiridas durante o Estágio Curricular	3
2. BRUCELOSE.....	5
2.1 História	5
2.2 Situação actual no Mundo e em Portugal.....	6
2.3 Etiologia	8
2.3.1 Descrição do agente etiológico	8
2.3.2 Espécies de Brucella, Animais Sensíveis e Hospedeiros Preferenciais	9
2.3.3 Diferenciação entre espécies	9
2.4 Transmissão	12
2.4.1 Vias e Produtos infectantes	12
2.4.2 Factores de risco	13
2.5 Patogenia da infecção.....	16
2.5.1 Por <i>B. abortus</i>	16
2.5.2 Por <i>B. melitensis</i>	17
2.5.3 Por <i>B. suis</i>	18
2.6 Sintomas e Lesões	18
2.6.1 Da infecção por <i>B. abortus</i>	18
2.6.2 Da infecção por <i>B. melitensis</i>	19
2.6.3 Da infecção por <i>B. suis</i>	20
2.7 Brucelose humana	20
2.8 Diagnóstico	22
2.8.1 Provas serológicas.....	23
2.8.2 Provas alérgicas	24
2.8.3 Provas para detecção do agente	24
2.9 Tratamento	25
2.10 Prevenção e Controlo	25
2.10.1 Programas de Erradicação de Brucelose (PEB).....	25
2.10.2 Programa de Erradicação de BB para Portugal	25
2.10.3 Programa de Erradicação de BB para a região do Alentejo	31
2.10.4 Vacinas disponíveis no combate à brucelose.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37

3.1	Recolha e processamento dos dados	37
3.1.1	Inquérito Epidemiológico (IE)	37
3.1.2	Recolha e análise das informações sanitárias das explorações.....	38
3.1.3	Georreferenciação das explorações.....	39
3.1.4	<i>Software</i>	40
3.2	Objecto de Estudo.....	40
3.2.1	Descrição das Explorações Alvo	40
3.2.2	Caracterização da Região.....	42
3.3	Vacinação	47
4.	RESULTADOS.....	49
4.1	UE1 (explorações VJ31B, VK41A, VU58F e VU71A).....	50
4.1.1	Características comuns a todas as explorações da UE1.....	50
4.1.2	Características específicas de cada uma das explorações da UE1.....	52
4.1.3	Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE1.....	53
4.1.4	Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE1	59
4.2	UE2 (exploração VJ18B).....	61
4.2.1	Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE2.....	62
4.2.2	Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE2	63
4.3	UE3 (exploração VJ21A).....	64
4.3.1	Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE3.....	65
4.3.2	Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE3	66
4.4	UE4 (exploração VP18D).....	67
4.4.1	Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE4.....	68
4.4.2	Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE4	69
5.	DISCUSSÃO	71
6.	CONCLUSÕES	83
7.	BIBLIOGRAFIA	85
	ANEXOS	88
	Anexo 1.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial de <i>Brucella abortus</i> no período de Junho-Dezembro de 2009.....	6
Figura 2 – Distribuição mundial de <i>Brucella melitensis</i> no período de Junho-Dezembro de 2009.....	6
Figura 3 – Distribuição mundial de <i>Brucella suis</i> no período de Junho-Dezembro de 2009...	7
Figura 4 – Relação filogenética entre espécies e biovars da mesma espécie, recorrendo a dados recolhidos por análise, com 71 marcadores, a 21 estirpes de referência (realizado por MLVA - <i>multiple loci variable number of tandem repeats analysis</i>).....	12
Figura 5 – Progressão da infecção por <i>B. abortus</i> em animais adultos susceptíveis	17
Figura 6 – Esquema simplificado dos critérios para a subida ou descida de estatuto sanitário para as explorações seropositivas e/ou infectadas por BB (Fonte: DGV, 2010).....	28
Figura 7 – Fluxograma representativo da metodologia aplicada na construção da BD.....	39
Figura 8 – GPS utilizado no terreno para recolha de coordenadas dos pontos limítrofes das explorações alvo.	39
Figura 9 – Fluxograma representativo da metodologia de análise e interpretação dos dados e ilustração das conclusões.	40
Figura 10 – Concelhos pertencentes à área de intervenção da DIV de Elvas e localização das explorações bovinas incluídas na avaliação epidemiológica (Mapa original).	41
Figura 11 – Número total médio de bovinos saneados, por freguesia, no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2008 e 17 de Julho de 2009 (Mapa original).....	44
Figura 12 – Prevalência de explorações com bovinos seropositivos por freguesia no ano de 2008 (Mapa original).	45
Figura 13 – Prevalência de explorações com bovinos seropositivos por freguesia no período compreendido entre 1 de Janeiro e 17 de Julho de 2009 (Mapa original).....	45
Figura 14 – Prevalência de bovinos seropositivos por freguesia no ano de 2008 (Mapa original).	46
Figura 15 – Prevalência de bovinos seropositivos por freguesia no período compreendido entre 1 de Janeiro e 17 de Julho de 2009 (Mapa original).....	46
Figura 16 – Vacina utilizada na campanha de vacinação.	47
Figura 17 – Técnica de vacinação das novilhas da exploração VU58F (Fotografias originais).	47
Figura 18 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VJ31B, no período compreendido entre 4 de Fevereiro de 2003 e 4 de Março de 2009.	55
Figura 19 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VK41A, no período compreendido entre 14 de Janeiro de 2003 e 23 de Março de 2009.	56

Figura 20 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VU58F no período compreendido entre 19 de Maio de 2003 e 20 de Fevereiro de 2009.	57
Figura 21 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VU71A no período compreendido entre 27 de Abril de 2003 e 13 de Abril de 2009.	59
Figura 22 – Espécies e biovars de <i>Brucella spp</i> isoladas a partir de órgãos de animais provenientes das explorações indicadas (Mapa original).	61
Figura 23 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VJ18B no período compreendido entre 4 de Maio de 2003 e 28 de Fevereiro de 2009.....	63
Figura 24 – Espécies e biovars de <i>Brucella spp</i> isoladas a partir de órgãos de animais provenientes das explorações indicadas (Mapa original).	64
Figura 25 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VJ21A no período compreendido entre 26 de Maio de 2003 e 15 de Novembro de 2008.	66
Figura 26 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VP18D no período compreendido entre 13 de Março de 2000 e 11 de Fevereiro de 2009...	69
Figura 27 – Espécies e biovars de <i>Brucella spp</i> isoladas a partir de órgãos de animais provenientes da exploração indicada (Mapa original).....	70
Figura 28 – Principais eventos com importância sanitária na UE1.....	74
Figura 29 – Principais eventos com importância sanitária na UE2.....	74
Figura 30 – Principais eventos com importância sanitária na UE3.....	75
Figura 31 – Principais eventos com importância sanitária na UE4.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados da prevalência de BB em Portugal Continental e Alentejo (dados relativos ao nº de explorações).	7
Tabela 2 – Dados da prevalência de BB em Portugal Continental e Alentejo (dados relativos ao nº de animais).	8
Tabela 3 – Características diferenciais das espécies do género <i>Brucella spp</i>	10
Tabela 4 – Características para a diferenciação das biovars de espécies de <i>Brucella spp</i>	11
Tabela 5 – Efectivo bovino médio nos concelhos abrangidos pela DIV de Elvas no período de 1 de Janeiro de 2008 a 17 de Julho de 2009.....	42
Tabela 6 – Efectivos bovinos vacinados com RB51.....	48
Tabela 7 – Resumo das principais características produtivas e de biossegurança das explorações alvo.	50

Tabela 8 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VJ31B.	54
Tabela 9 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VK41A.	56
Tabela 10 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VU58F.	57
Tabela 11 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VU71A.	58
Tabela 12 – Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes das explorações VJ31B, VK41A, VU58F e VU71A.	60
Tabela 13 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VJ18B.	62
Tabela 14 - Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes da exploração VJ18B.	63
Tabela 15 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VJ21A.	65
Tabela 16 - Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes da exploração VJ21A.	66
Tabela 17 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VP18D.	69
Tabela 18 – Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes da exploração VP18D.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

B2 – Estatuto Sanitário de Exploração Não Indemne de Brucelose

B2.1 – Estatuto Sanitário de Exploração Infectada por Brucelose

B3 – Estatuto Sanitário de Exploração Indemne de Brucelose

B3S – Estatuto Sanitário de Exploração Indemne de Brucelose Suspenso

B4 – Estatuto Sanitário de Exploração Oficialmente Indemne de Brucelose

B4S – Estatuto Sanitário de Exploração Oficialmente Indemne de Brucelose Suspenso

BB – Brucelose Bovina

BD – Base de Dados

Brucella spp – espécies pertencentes ao género *Brucella*

DGS – Direcção Geral da Saúde

DGV – Direcção Geral de Veterinária

DIV – Divisão de Intervenção Veterinária

DRVR – Direcção de Serviços Veterinários da Região

DSVRALT – Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FC – Fixação do Complemento

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

GNR – Guarda Nacional Republicana

GPS – *Global Position System*

I – Estatuto Sanitário de Oficialmente Indemne de Peripneumonia Contagiosa dos Bovinos

IA – Inseminação Artificial

IE – Inquérito Epidemiológico

IFAP – Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas

INGA – Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola

L4 – Estatuto Sanitário de Oficialmente Indemne de Leucose Enzoótica Bovina

LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

LPS – Lipopolissacárido

ml – mililitro

MLVA – *Multiple Loci Various Number of Tandem Repeats Assay*

mm – milímetro

MOE – Marca Oficial de Exploração

MS – *Microsoft*

MV – Médico Veterinário

MVA – Médico Veterinário Assistente

nº - número

°C – graus Célsius

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (*Office International des Epizooties*)

OPP – Organizações de Produtores Pecuários

Pa – Prevalência de Brucelose Bovina por Freguesia em termos de Bovinos Seropositivos

PAMP – Modelo Molecular Associado ao Patogénio

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Pe – Prevalência de Brucelose Bovina por Freguesia em termos de Explorações Seropositivas

PEB – Programas de Erradicação de Brucelose

PIS – Plano Individual de Saneamento

PISA – Programa Informático de Saúde Animal

RB – Rosa Bengala

RB51 – Vacina para a BB com a Estirpe Rugosa *RB51*

Rev 1 – Vacina Viva Atenuada contra Brucelose dos Pequenos Ruminantes estirpe *Rev 1*

SDS-PAGE – Electroforese em Agar-gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SIG – Sistema de Informação Geográfica

SNIRA – Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal

SNIRB – Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos

SVR – Serviços Veterinários Regionais

T3 – Estatuto Sanitário de Oficialmente Indemne de Tuberculose

UE – Unidade Epidemiológica

UFC – Unidade Formadora de Colónias

UTL – Universidade Técnica de Lisboa

VLA – Vírus da Língua Azul

1. INTRODUÇÃO

No âmbito do Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária desenvolvido inicialmente na Divisão de Intervenção Veterinária (DIV) de Elvas, foi efectuada uma análise epidemiológica de um programa de vacinação contra a Brucelose Bovina com a vacina viva atenuada RB51 em sete explorações de bovinos.

No período que decorreu entre 16 de Fevereiro e 17 de Julho de 2009 na DIV de Elvas foram desenvolvidas, pelo autor, diversas actividades (supervisionadas pelo Chefe de Divisão), na zona de intervenção da referida divisão, no âmbito da documentação, da execução de inquéritos epidemiológicos (IE) em focos já referenciados ou em situações de suspeita de Brucelose (Bovina e dos Pequenos Ruminantes) ou Tuberculose com participação na identificação, no isolamento e no posterior envio para abate de animais seropositivos. Também se efectuaram outras actividades como o acompanhamento de vistorias efectuadas aos estabelecimentos de transformação de produtos de origem animal (queijarias e salsicharias, fundamentalmente). Foram recolhidos os dados referentes às explorações incluídas na área da DIV de Elvas e foi efectuada a recolha e avaliação dos dados referentes a 7 explorações com animais infectados por Brucelose Bovina (BB) que foram objecto de um programa de vacinação com RB51.

Numa segunda fase, decorrida na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), no período compreendido entre 1 e 30 de Setembro de 2009, o autor adquiriu conhecimentos no âmbito dos Sistemas de Informação Geográfica (SIG), na construção de bases de dados e na análise de dados epidemiológicos. Estes conhecimentos foram aplicados nesta dissertação para caracterizar a situação da BB na região da DIV de Elvas e a evolução epidemiológica da BB nas explorações de bovinos com animais vacinados.

Na estrutura da dissertação é apresentada inicialmente uma revisão bibliográfica, sobre a BB, eminentemente vocacionada para os aspectos epidemiológicos e factores de risco relacionados com a doença. Seguidamente é descrita a situação da doença na região da DIV de Elvas e nas unidades epidemiológicas (UE) incluindo as explorações analisadas. Numa terceira fase, é efectuada a análise epidemiológica da BB verificada durante o período estudado nas UE.

1.1 Actividades relacionadas com o Programa de Vacinação

No período de estágio curricular decorrido na DIV de Elvas o autor realizou várias deslocações às explorações alvo com o intuito de efectuar uma pré-caracterização das mesmas.

Para esta pré-caracterização foram recolhidas, nos pontos limítrofes das explorações, as coordenadas que permitiram a georreferenciação das mesmas, foram realizados IE ao detentores das explorações ou aos encarregados, avaliadas as condições de manejo (alimentar, produtivo e reprodutivo, fundamentalmente) e também as condições de biossegurança presentes.

Durante o referido período de estágio, foi também possível ao autor efectuar outras visitas com o objectivo de auscultar as opiniões dos detentores acerca do programa de vacinação e registar as últimas ocorrências em cada uma das explorações inseridas no programa, nomeadamente, procurando saber se teriam ocorrido recentemente abortos ou outras alterações reprodutivas ou produtivas significativas.

O autor teve ainda a oportunidade de acompanhar uma revacinação numa das explorações incluídas no estudo.

1.2 Outras actividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular

Durante o período de estágio na DIV de Elvas o autor participou em numerosas actividades, todas elas supervisionadas pelo Chefe de Divisão ou pelos Médicos Veterinários que desempenham funções naquela divisão, das quais são de salientar, no âmbito da sanidade animal:

- A execução de IE em focos ou suspeitas de Brucelose (bovina e dos pequenos ruminantes), num total de 82, ou de Tuberculose Bovina, num total de 2;
- A participação na identificação e isolamento para abate sanitário dos animais reagentes nas provas serológicas de rotina do programa de erradicação de brucelose (Rosa Bengala e/ou Fixação do Complemento) em 14 focos de brucelose na área de acção da DIV de Elvas, 2 de BB e os restantes 12 dos pequenos ruminantes, surgidos durante o período de estágio curricular;
- O acompanhamento da realização de IE e imposição de sequestro a explorações em situações de suspeita de Língua Azul (Febre Catarral Ovina), bem como a participação na recolha de sangue e envio ao Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), para pesquisa virológica, em 2 situações de suspeita referenciadas pelos Médicos Veterinários Assistentes (MVA) àquela divisão;
- A execução de IE, sensibilização do produtor e desparasitação dos cães numa exploração ovina com suspeita de Equinococose (a identificação desta situação foi referenciada à DSVRALT pelo Inspector Sanitário, após o achado de necrópsia de Quisto Hidático num ovino adulto enviado para abate para consumo);
- A realização, conjunta com funcionários da DIV de Elvas, da identificação e listagem dos animais presentes em duas explorações de ovinos com suspeita de Tremor Epizoótico Atípico;

- A execução, conjuntamente com o Veterinário Municipal de Elvas, de recolhas de material da mucosa oro-faríngea, por zaragatoa, em duas explorações de aves (uma de patos e outra de pavões e perus) no âmbito do programa de vigilância activa da Gripe Aviária.

O autor desempenhou ainda actividades no âmbito da Higiene e Segurança Alimentar naquela divisão, onde se destacam o acompanhamento de vistorias a salas de recolha de leite (8), queijarias (32), salsicharias (20), empresas de *catering* (2) e pastelarias (2) que transformam produtos cárneos (fabrico de empadas, rissóis, etc.). Foi igualmente acompanhada uma vistoria a um entreposto frigorífico com sala de desmancha e embalagem de aves. Neste âmbito o autor criou uma base de dados para introdução das informações recolhidas por ocasião das vistorias incluindo as não conformidades detectadas para avaliação da evolução da situação em vistorias subsequentes.

No âmbito do bem-estar animal, foram acompanhadas algumas das visitas a explorações para avaliação das condições de manejo, alojamento e alimentação, obrigatórias no processo de atribuição das marcas oficiais de exploração (MOE).

Foram ainda acompanhadas pelo autor, no âmbito do programa de controlo de resíduos, acções de recolha de alimentos compostos utilizados em explorações de engorda de bovinos e em explorações de suínos, para posterior envio ao laboratório para pesquisa de substâncias não autorizadas.

1.3 Competências adquiridas durante o Estágio Curricular

No estágio curricular o autor teve oportunidade de adquirir variadíssimas competências das quais se destacaram:

- A aquisição de conhecimentos no âmbito dos protocolos de execução de IE (referentes às várias doenças acima descritas);
- A implementação de rotinas de observação compatíveis com os protocolos de vistoria a estabelecimentos de transformação de produtos de origem animal;
- A aprendizagem na elaboração de autos de vistoria a ser enviados aos proprietários dos estabelecimentos acima indicados;
- A aquisição de conhecimentos de legislação e avaliação no terreno, necessários às vistorias efectuadas para o licenciamento de explorações, principalmente no que concerne à questão do bem-estar animal;
- A capacidade de avaliação das condições de transporte de animais, da aptidão dos veículos (estado de conservação, higiene e bem-estar animal), do estado geral de saúde dos animais, necessários para a emissão e validação de um certificado de exportação;
- A aquisição de conhecimentos no âmbito dos programas informáticos de sanidade animal (PISA.net™ e SNIRA, fundamentalmente);

- A familiarização com os protocolos de recolha de alimentos concentrados para posterior pesquisa de resíduos medicamentosos não autorizados;
- A aquisição de competências no âmbito dos mecanismos e implicações inerentes às imposições de sequestro às explorações suspeitas ou focos de doenças como a Brucelose (bovina e dos pequenos ruminantes), Tuberculose, Língua Azul ou Tremor Epizoótico Atípico;
- Aprendizagem das metodologias de recolha e acondicionamento das amostras de sangue para envio ao LNIV para pesquisa de Vírus da Língua Azul (VLA) por *Polimerase Chain Reaction* (PCR).
- Aquisição de conhecimentos básicos de epidemiologia e de gestão de bases de dados;
- Iniciação ao estudo dos Sistemas de Informação Geográfica (SIG) indispensáveis, não só para a composição dos mapas adiante apresentados, mas para uma correcta análise das relações geo-epidemiológicas das explorações inseridas no estudo.

2. BRUCELOSE

2.1 História

A brucelose enquanto zoonose parece ser tão antiga como a própria Humanidade, ou até anterior a ela, de facto, estudos recentes do esqueleto de um homínido encontrado em Sterkfontein, na África do Sul, apontam para a forte possibilidade deste homínido, que se pensa ter vivido no final do período Pliocénico (entre 2,4 e 2,8 milhões de anos atrás), ter sido infectado por bactérias do género *Brucella spp.* Esta suspeita deve-se ao facto das análises macroscópica, microscópica e radiológica das lesões observadas nas vértebras L4 e L5 deste esqueleto, apontarem para a presença de lesões de osteólise consistentes com um quadro de brucelose (D'Anastasio, Zipfel, Moggi-Cecchi, Stanyon, & Capasso, 2009).

É com o Capitão David Bruce, um oficial da Marinha Real Britânica, destacado em Malta que, em 1887, se fazem as primeiras pesquisas no sentido de clarificar a origem dos sintomas febris e reumáticos apresentados por um elevado número de militares enviados para aquela região. Ele e a sua equipa isolaram um agente a que chamaram *Micrococcus melitensis* (a partir de exames *post mortem* a baços de humanos afectados). Themistocles Zammit, na ilha de Malta, isolou o agente a partir do sangue de cabras autóctones, confirmando a suspeita da origem da infecção humana (Wyatt, 1999).

Praticamente contemporâneos destas descobertas são os primeiros isolamentos, por parte de um patologista e bacteriologista dinamarquês, L. F. Benhard Bang, que em 1897, isolou um microrganismo causador de aborto em bovinos e que designou de *Bacillus abortus*. É como tributo a este investigador que durante alguns anos ainda se designou a brucelose bovina por “doença de Bang” (Nicoletti, 2002).

Em 1914, é isolada pela primeira vez, por Traum, *Brucella suis* a partir de um feto de suíno abortado no estado do Indiana nos Estados Unidos da América (EUA) (Straw, Zimmerman, D'Allaire, & Taylor, 2006). Destes últimos avanços e das descrições mais pormenorizadas que lhe advieram foi possível reconhecer a distribuição praticamente global de bactérias deste género (Nicoletti, 2002).

Estas três espécies foram posteriormente renomeadas e incluídas no género *Brucella spp.*, em honra de David Bruce.

Nascida poucos anos antes do primeiro isolamento em Malta, Alice C. Evans (1881-1975), uma das primeiras mulheres cientistas nos EUA, desempenhou um papel fulcral no conhecimento da doença a que se viria chamar brucelose. A ela se devem os estudos comparativos, publicados em 1917, que revelam a similaridade entre as duas espécies, então designadas por *Micrococcus melitensis* e *Bacillus abortus*. A ela devemos o reconhecimento da doença como um problema de saúde pública e a necessidade da pasteurização do leite como medida de prevenção da infecção em humanos (Parascandola, 1998).

2.2 Situação actual no Mundo e em Portugal

Nos mapas seguidamente apresentados é visível a distribuição actual das 3 espécies do género *Brucella spp* mais relevantes, em termos de saúde pública, no mundo: *Brucella abortus* (Figura 1), *B. melitensis* (Figura 2) e *B. suis* (Figura 3).

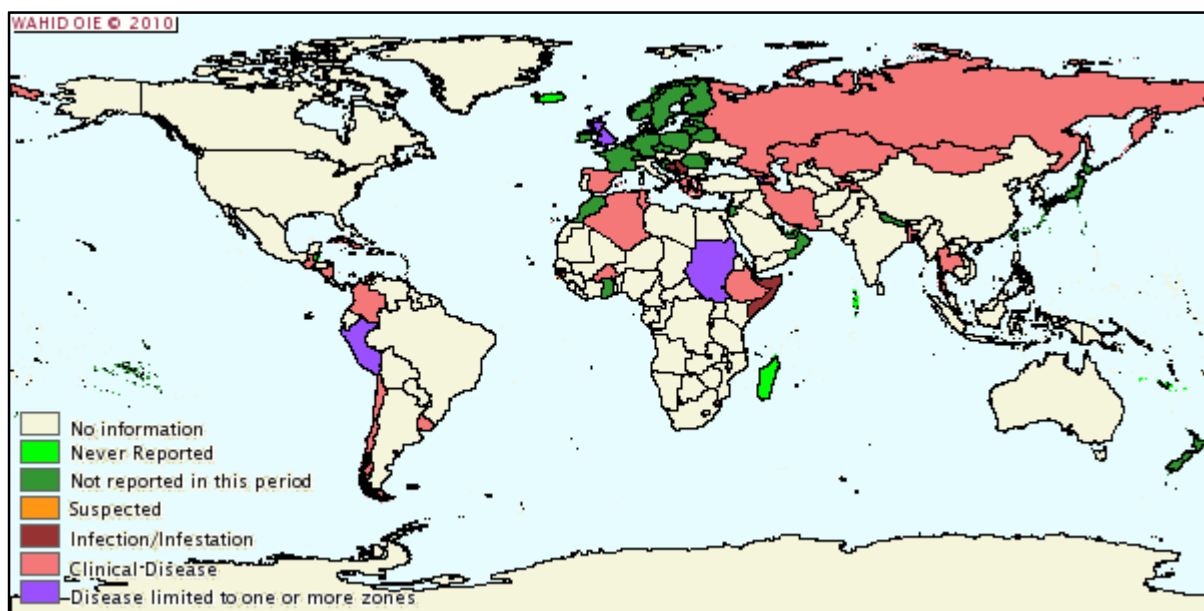


Figura 1 – Distribuição mundial de *Brucella abortus* no período de Junho-Dezembro de 2009. (Fonte: OIE, 2010)

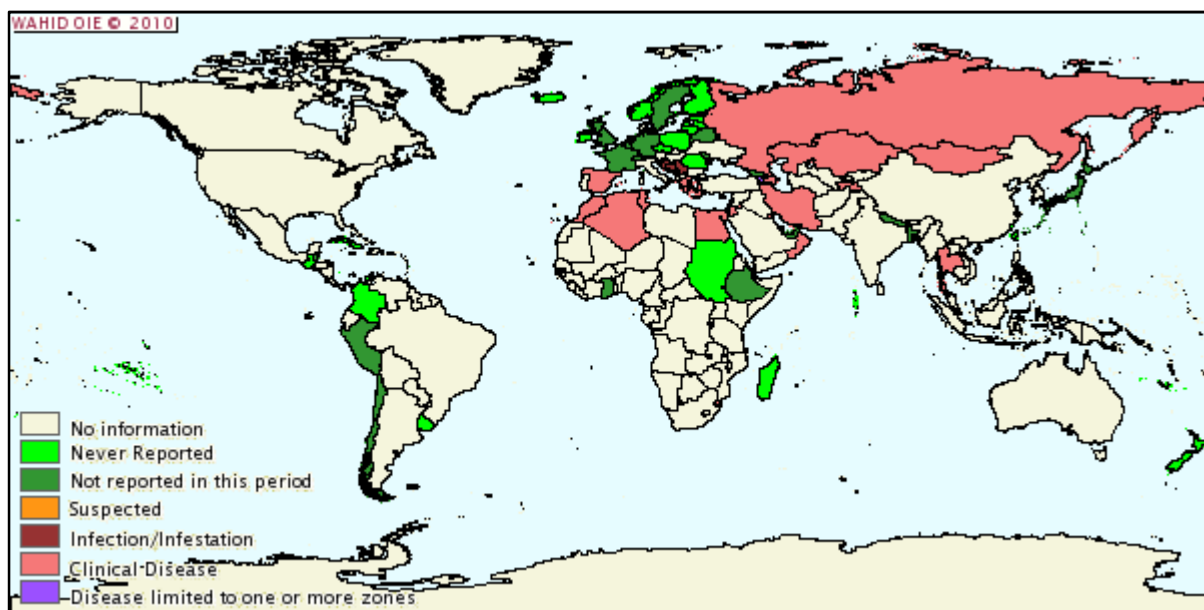


Figura 2 – Distribuição mundial de *Brucella melitensis* no período de Junho-Dezembro de 2009. (Fonte: OIE, 2010)

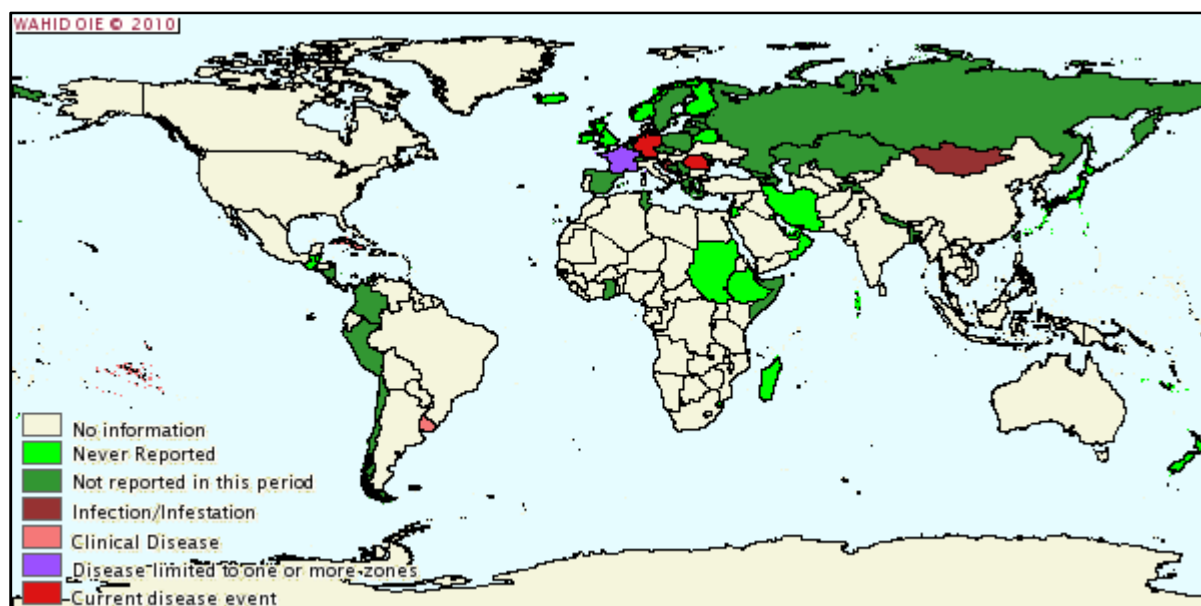


Figura 3 – Distribuição mundial de *Brucella suis* no período de Junho-Dezembro de 2009. (Fonte: OIE, 2010)

Nas tabelas 1 e 2 a seguir apresentadas é apresentada a informação relativa à BB em Portugal Continental da última década, fundamentalmente, no que respeita a explorações e animais infectados. São também apresentados os dados relativos à região do Alentejo e que demonstram a importância desta região na produção bovina nacional, com um efectivo bovino que representa cerca de 51% do total (dados da Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo – DSVRALT).

Tabela 1 – Dados da prevalência de BB em Portugal Continental e Alentejo (dados relativos ao nº de explorações). (Adaptado de: DSVRALT, 2008; DGV, 2009; DGV, 2010)

Ano	Portugal Continental			DSVRALT (*)		
	Nº de explorações controladas	Nº de explorações positivas	% de explorações positivas	Nº de explorações controladas	Nº de explorações positivas	% de explorações positivas
2000	-	-	-	5.165	124	2,401
2001	-	-	-	6.112	74	1,211
2002	87.809	477	0,543	5.870	51	0,869
2003	66.065	292	0,442	5.272	70	1,328
2004	62.353	418	0,670	4.922	99	2,011
2005	57.319	271	0,473	4.872	81	1,663
2006	52.635	266	0,505	4.872	96	1,970
2007	44.797	177	0,395	4.848	71	1,465
2008	41.135	203	0,493	4.493	67	1,491
2009	40.443	246	0,608	4.413	53	1,201

(*) DSVRALT: Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo.

Tabela 2 - Dados da prevalência de BB em Portugal Continental e Alentejo (dados relativos ao nº de animais). (Adaptado de: DSVRALT, 2008; DGV, 2009; DGV, 2010)

Ano	Portugal Continental			DSVRALT (*)		
	Nº de animais controlados	Nº de animais positivos	% de animais positivos	Nº de animais controlados	Nº de animais positivos	% de animais positivos
2000	-	-	-	293.896	1.065	0,362
2001	-	-	-	342.765	1.320	0,385
2002	1.009.590	2.287	0,227	359.408	1.180	0,328
2003	837.897	1.905	0,227	342.164	959	0,280
2004	804.248	2.434	0,303	338.756	1.537	0,454
2005	810.894	2.545	0,314	357.523	1.876	0,525
2006	802.545	1.575	0,196	371.242	950	0,256
2007	798.657	1.083	0,136	391.883	669	0,171
2008	818.648	1.101	0,134	413.816	545	0,132
2009	857.139	1.268	0,148	437.152	500	0,114

(*) DSVRALT: Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo

2.3 Etiologia

2.3.1 Descrição do agente etiológico

As bactérias do género *Brucella spp* têm uma distribuição ubiquitária afectando e provocando doença num número elevado de espécies de mamíferos, incluindo o Homem. São parasitas intracelulares facultativos e tendem a infectar preferencialmente células do sistema retículo-endotelial e órgãos do tracto genital, sendo vulgarmente responsáveis pela incidência de abortos, epididimites ou orquites nos seus hospedeiros (Hirsh & Zee, 1999). São coco bacilos gram-negativos que medem 0,6 a 1,5µm por 0,5 a 0,7µm e, embora se possam encontrar aos pares ou em pequenos aglomerados, encontram-se, mais frequentemente, isoladas. Pertencem à família *Brucellaceae* e relacionam-se filogeneticamente com *Ochrobactrum* no sub-grupo α-2 das *Proteobacteriaceae* (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002).

Num meio de cultura como o agar-soro-dextrose as colónias de bactérias do género *Brucella spp* são: pequenas, translúcidas, convexas, circulares, de bordos definidos e, a contra-luz, brilhantes e ligeiramente opalescentes (Villarreal, Grell, & Saenz, 2000).

Não possuem cápsula e não têm capacidade de esporular, sendo microrganismos acidófilos que coram de vermelho com a modificação de *Stamp* da coloração de *Ziehl-Neelsen*. A maioria das estirpes de campo é de crescimento lento e fastidioso, requerendo, para o isolamento primário, períodos de incubação que podem chegar às 6 semanas e suplementações de dióxido de carbono (CO₂) entre os 5 e os 10%, a temperaturas entre os 36 e os 38°C (Coetzer & Tustin, 2004).

Dentro do género, é a *B. abortus* a espécie que apresenta necessidades mais específicas em relação ao meio de cultura, pois apesar de todas as estirpes crescerem relativamente bem em meios contendo agar-sangue, é em meios contendo soro sanguíneo e dextrose que as colónias são mais facilmente diferenciáveis. O uso de meios selectivos como o de *Farrell* pode efectivamente aumentar a probabilidade de isolamento desta espécie, não sendo de desprezar, no entanto, o facto de este isolamento necessitar de mais tempo, além das comuns duas a três semanas, pois a taxa de crescimento de *B. abortus* é significativamente reduzida por este meio (Coetzer & Tustin, 2004).

2.3.2 Espécies de *Brucella*, Animais Sensíveis e Hospedeiros Preferenciais

O género *Brucella* spp divide-se em oito espécies distintas, capazes de infectar mamíferos terrestres: *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. microti* e *B. inopinata*; e em duas espécies capazes de infectar mamíferos aquáticos: *B. ceti* e *B. pinnipedialis* (Tabela 3). O conhecimento das duas últimas espécies enumeradas é relativamente recente, só tendo sido levados a cabo durante o ano de 2007 os estudos de tipificação que as identificaram como duas espécies distintas dentro do género *Brucella* spp. As designações actuais destas duas espécies substituem a anterior denominação de *B. maris*, encontrada em alguns artigos mais antigos (Foster, Osterman, Godfroid, Jacques, & Cloeckaert, 2007). Foram igualmente substituídas as designações de *B. pinnipediae* e *B. cetaceae*, encontradas em estudos de tipificação de ADN e realizados a partir de 21 estirpes, representativas das diferentes espécies deste género (Le Flèche *et al.*, 2006).

A *B. inopinata* é a mais recente espécie a ser incluída no género, tendo sido isolada, no Canadá, a partir de um implante mamário de uma mulher de 71 anos de idade que apresentava um quadro clínico coerente com brucelose. As tipificações a que foi submetido este novo isolado revelaram as grandes diferenças, tanto a nível fenotípico como molecular, que este manifestava em relação às demais espécies de *Brucella* spp., justificando a sua classificação como uma nova espécie e a proposta de designação de *B. inopinata* estirpe BO1(T) (Scholz, *et al.*, 2010).

2.3.3 Diferenciação entre espécies

A distinção entre espécies, bem como entre biovars da mesma espécie, pode ser feita através do recurso a baterias de exames laboratoriais entre os quais se contam: a avaliação da necessidade de CO₂, a produção de H₂S, a produção de urease, a susceptibilidade a concentrações variáveis de determinados corantes (tionina e fuscina básica, por exemplo), entre outros (Hirsh & Zee, 1999), conforme evidenciado nas tabelas 3 e 4, onde são também enumerados os hospedeiros preferenciais de cada espécie.

Tabela 3 - Características diferenciais das espécies do género *Brucella* spp. Adaptado de: (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2009).

Espécie	Morfologia da Colónia	Necessidade de soro sanguíneo	Lise por Fagocitos ^b					Oxidase	Urease	Hospedeiro preferencial
			Tb	Wb	Iz ₁	R/C				
			RTD ^a	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD			
<i>B. abortus</i>	Lisa	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Bos taurus</i> e outros Bovidae
<i>B. suis</i>	Lisa	-	-	+	+	+	-	+	+	Biovar 1: suínos
										Biovar 2: suínos e lebres
										Biovar 3: suínos
										Biovar 4: renas
										Biovar 5: roedores silvestres
<i>B. melitensis</i>	Lisa	-	-	-	-	+	-	+	+	Ovinos e caprinos
<i>B. neotomae</i>	Lisa	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>Neotoma lepida</i>
<i>B. ovis</i>	Rugosa	+	-	-	-	-	+	-	-	Carneiros
<i>B. canis</i>	Rugosa	-	-	-	-	-	+	+	+	Canídeos
<i>B. ceti</i>	Lisa		+		+	+	-	+	+	Cetáceos
<i>B. pinnipedialis</i>	Lisa		+		+	+	-	+	+	Pinípedes
<i>B. microti</i>	Lisa	-	-	+	+	+	-	+	+	Ratazana comum

Legenda:

a: RTD: *Routine Test Dilution*

b: Fagocitos: *Tbilisi* (Tb), *Weybridge* (Wb), *Izatnagar1* (Iz₁) e *R/C*.

Todas as espécies incluídas no género *Brucella* spp. são aerófilas e capnofílicas e, à excepção de *B. ovis* e *B. neotomae*, são oxidase-positivas (Quinn, Markey, Carter, Donnelly, & Leonard, 2002).

As bactérias do género *Brucella* spp existem, na natureza, nas formas lisa ou rugosa, dependendo da espécie a que pertencem. Este aspecto, liso ou rugoso, das colónias formadas pelas diferentes espécies de *Brucella*, está intimamente ligado à presença ou ausência da cadeia O lateral do lipopolissacárido (LPS), respectivamente. Os organismos lisos possuem, na constituição do LPS, uma cadeia lateral (cadeia O), um homopolímero de perosamina (N-formil-4-amino-4,6-dideoximanose), o que não acontece nos organismos rugosos que apenas apresentam uma porção truncada desta cadeia (Moreno, 1984).

Tabela 4 - Características para a diferenciação das biovars de espécies de *Brucella spp.* Adaptado de: OIE, 2009.

Espécie	Biovar	Necessidade de CO ₂	Produção de H ₂ S	Crescimento nos corantes		Aglutinação com soros monospecíficos		
				Tionina	Fuscina básica	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	-	+	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+/-	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	+	+	-
	5	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>B. ceti</i>	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>B. pinnipedialis</i>	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>B. microti</i>	-	-	-	+	+	-	+	-

Legenda: Os símbolos + e - representam, respectivamente, presença ou ausência das características avaliadas.

Esta estrutura confere ao LPS de *Brucella spp* características que o transformam num factor de virulência que altera o modelo molecular associado ao patógeno (PAMP) reduzindo, simultaneamente, as propriedades típicas relacionadas com a endotoxina do LPS. Ao contrário do LPS de diversas *Enterobacteriaceae*, o das bactérias do género *Brucella spp*, é cerca de 100 vezes menos tóxico e activo que o de *Escherichia coli*, por exemplo (Serafino, Conde, Zabal, & Samartino, 2007).

Das espécies anteriormente enumeradas, apenas *B. ovis* e *B. canis* existem na natureza na forma rugosa. Estas duas últimas espécies, embora bastante virulentas quando infectam os seus hospedeiros habituais (ovinos e canídeos, respectivamente), apresentam uma maior dificuldade em infectar outros hospedeiros (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002).

Apesar desta classificação por espécie e *biovar* ser amplamente utilizada, estudos de hibridação ADN-ADN levados a cabo por Verger J.M., et al. (1985), apontaram para a

evidência de que o grau de similaridade genética entre as bactérias do género é superior a 90% (Le Flèche, et al., 2006).

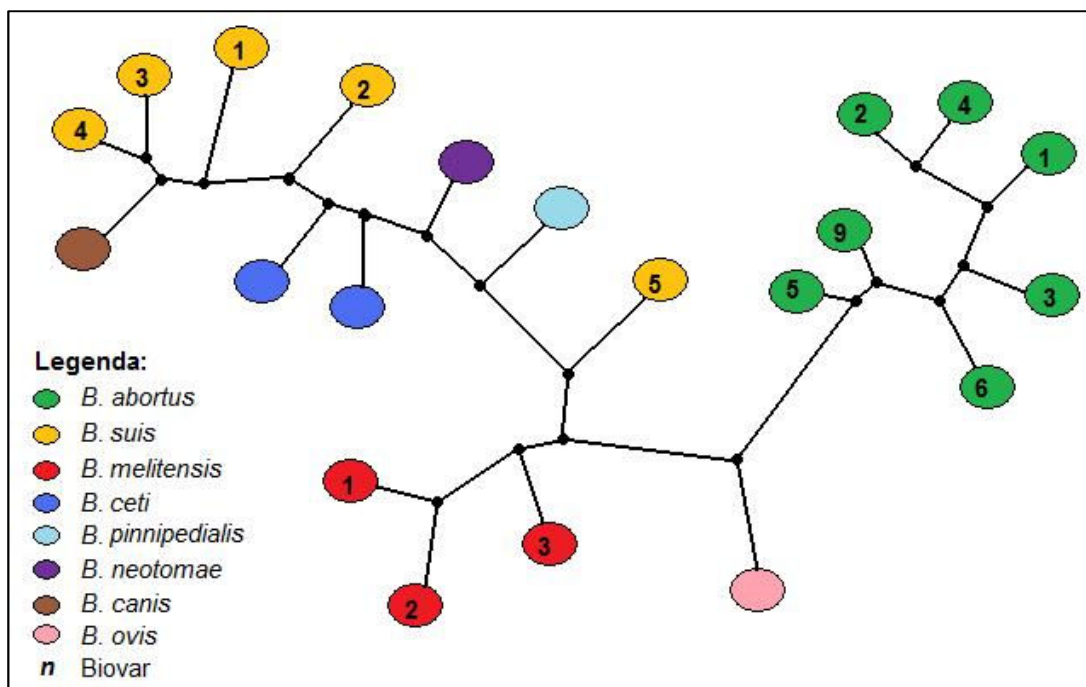


Figura 4 – Relação filogenética entre espécies e biovars da mesma espécie, recorrendo a dados recolhidos por análise, com 71 marcadores, a 21 estirpes de referência (realizado por MLVA - *multiple loci variable number of tandem repeats analysis*). Adaptado de: Le Flèche et al., 2006.

2.4 Transmissão

2.4.1 Vias e Produtos infectantes

A brucelose dissemina-se por contacto directo ou indirecto com animais infectados. Apesar de a via de infecção principal ser a ingestão, a exposição ao agente por via conjuntival, genital, através da pele ou do tracto respiratório estão também descritas como vias de infecção possíveis, sendo os fetos abortados, as placentas e o corrimento vulvar pós-aborto, os produtos infectantes por excelência. A infecção das glândulas sexuais acessórias dos machos pode também permitir a disseminação do microrganismo através do sêmen (Hirsh & Zee, 1999). No entanto, a transmissão venérea de touros a vacas parece ser rara. Pode ocorrer por inseminação artificial (IA) com sêmen infectado quando introduzido no útero. A inseminação artificial depositando o sêmen a meio do cérvix uterino (entre a 2ª e a 3ª prega cervical) está reportada como não infectante (Kahn & Line, 2005).

As novilhas filhas de mães infectadas pode infectar-se *in utero* ou pelo consumo de colostro ou leite. Embora algumas possam apresentar remissão espontânea dentro de alguns meses, outras permanecem infectadas para a vida e actuam como agente disseminador da doença no primeiro parto e em parições ulteriores (Nicoletti, 1980).

São produtos infectantes as secreções, excreções, placentas, feto, líquidos fetais e o leite. O sangue, durante o período de bacteriemia, permanece infectante durante cerca de um ano em 90,4% dos bovinos, chegando mesmo aos 6 anos em 6% dos animais. Terminado o período de bacteriemia, as bactérias permanecem acantonadas nos linfonodos mamários e mesentéricos, na mucosa uterina, no fígado, no baço e na medula óssea, onde são responsáveis por períodos intermitentes de bacteriemia. Nos pequenos ruminantes, esta bacteriemia é mais fugaz, desaparecendo rapidamente (Ferreira & Ferreira, 1990).

Nos suínos, a transmissão de *B. suis* dentro de uma pocilga dá-se fundamentalmente pela ingestão ou pelo coito. A ingestão de comida contaminada por sémen infectado, urina ou descargas uterinas das porcas são também métodos de dispersão importantes. Alguns leitões são infectados pela ingestão de leite, outros adquirem-na congenitamente (Radostits, Gay, Blood, & Hinchcliff, 2000).

Nos pequenos ruminantes, a entrada de microrganismos pela ingestão, pela via nasal, conjuntival ou pela pele lesionada, a partir de descargas uterinas ou de placentas infectadas, estão descritas como as principais vias de infecção por *B. melitensis* (Radostits *et al.*, 2000).

2.4.2 Factores de risco

Os factores de risco associados à transmissão de brucelose variam consoante a espécie de *Brucella spp* envolvida, dependendo também da espécie animal sensível em questão. No entanto, factores relacionados com a resistência do organismo no meio ambiente, com a densidade populacional do(s) efectivo(s) em questão, com o período de permanência dos animais infectados nos efectivos e com a possibilidade de contacto entre efectivos com estatutos sanitários distintos, são transversais a todos os tipos de brucelose (Coetzer & Tustin, 2004).

2.4.2.1 Associados à transmissão de *B. abortus*

Os factores de risco associados à transmissão de BB podem ser divididos em dois grupos principais: os relacionados com a disseminação da infecção entre animais coabitantes e os relacionados com a transmissão entre efectivos distintos.

Em relação à disseminação da infecção dentro de um mesmo efectivo, um dos factores de risco comumente apontados como importante prende-se com a dimensão do mesmo. Assim, os efectivos de maiores dimensões tendem a apresentar valores altos de prevalência da infecção por bactérias do género *Brucella spp*. Esta situação pode dever-se, por um lado, ao facto de, por existir um maior número de animais coabitantes, a disseminação da infecção se poder processar muito mais rapidamente (Crawford, Huber, & Adams, 1990). Outros autores advogam que mais importante do que a dimensão absoluta dos efectivos, é a densidade populacional dos rebanhos infectados, correspondendo o aumento da

prevalência de BB de forma mais abrupta aos efectivos com maior densidade populacional (Radostitis *et al.*, 2007).

Outro dos factores de risco relacionados com o aumento da prevalência da infecção num determinado efectivo bovino, prende-se fundamentalmente com a tipologia e regime de produção (extensivo *versus* intensivo) da exploração pecuária em questão. As explorações intensivas com estabulação permanente, com um bom maneio reprodutivo, nomeadamente no que respeita aos locais destinados à separação dos animais no periparto (maternidades) e com eliminação dos produtos do parto e aborto tendem a apresentar índices de aumento da prevalência da infecção mais moderados, quando comparadas com explorações em regime extensivo, nas quais a eliminação dos produtos do parto e/ou aborto não é tão eficiente (Radostitis *et al.*, 2007).

Também o tempo de permanência dos animais seropositivos a BB em contacto com o restante efectivo susceptível coabitante está positivamente relacionado com um aumento da prevalência da infecção. Quando não existe um programa de erradicação, ou nos casos em que este não preveja a eliminação compulsiva dos animais infectados, a não vacinação dos animais susceptíveis coabitantes é outro dos factores de risco apontados como responsável pelo aumento exponencial dos índices de prevalência da infecção em determinada exploração (Coetzer & Tustin, 2004).

No que respeita aos factores de risco para a transmissão de *B. abortus*, relacionados com a infecção entre efectivos distintos, destacam-se, pela sua importância: a introdução de animais e a proximidade entre explorações infectadas e explorações indemnes com animais susceptíveis (Radostitis *et al.*, 2007).

Em relação à introdução de animais, factores como a proveniência dos mesmos, a frequência e dimensão da reposição externa praticada e o historial sanitário dos animais adquiridos, desempenham um papel fulcral na quantificação do risco associado a esta prática. É importante ainda referir que é normal as explorações de maiores dimensões recorrerem mais frequentemente à reposição dos seus efectivos reprodutores a partir da aquisição de animais de outras proveniências (Crawford, Huber, & Adams, 1990).

A proximidade entre explorações infectadas e explorações indemnes de BB é um dos factores de risco mais importantes na disseminação da infecção em determinada região. A existência de medidas de biossegurança insuficientes, de entre as quais se destacam as vedações simples (que são vulgarmente a única barreira física entre explorações contíguas permitindo o contacto entre animais infectados e potencialmente excretores e animais susceptíveis), a falta de controlo dos acessos de pessoas e veículos ou a partilha de alfaiais agrícolas estão referenciadas como factores de risco para a transmissão entre explorações da infecção por *B. abortus*. A partilha de pastagens e acessos com outros efectivos e a existência de transumância são também factores de risco para a transmissão de BB, com elevada importância, em regiões onde os animais não permanecem isolados (Paulin, 2006).

Importa ainda referir alguns factores de risco que são transversais aos dois tipos de disseminação da infecção (dentro das e entre as explorações). De entre eles destacam-se: factores ambientais, como a presença de zonas sombrias, com humidade relativa elevada e baixas temperaturas (Paulin, 2006); disseminação mecânica do agente, associada vulgarmente a espécies silvestres necrófagas, principalmente aves, com capacidade de transportar os produtos do parto e do aborto a distâncias consideráveis (Crawford, Huber, & Adams, 1990); e factores de risco associados à proporção de fêmeas maduras *versus* imaturas, uma vez que a susceptibilidade individual à infecção é maior nas primeiras do que nas segundas (Radostitis *et al.*, 2007).

2.4.2.2 Associados à transmissão de *B. melitensis*

Apesar da elevada resistência às condições ambientais e de poder persistir no ambiente, dentro de condições de humidade e temperatura favoráveis por mais de 1 ano, as bactérias da espécie *B. melitensis* são sensíveis à maioria dos agentes desinfectantes quando aplicados nas concentrações recomendadas. A infecção tende a ser autolimitante em rebanhos de pequenas dimensões com poucas introduções de animais novos devido ao período de excreção bacteriano ser curto, mas pode permanecer como um problema contínuo em rebanhos grandes, sobretudo naqueles em que as ovelhas não são isoladas no período do parto, contribuindo para uma contaminação ambiental massiva. A perpetuação de brucelose dos pequenos ruminantes pode acontecer sobretudo em zonas em que se pratica transumância ou partilha de pastagens entre diversos efectivos. Nos bovinos a disseminação da doença é muito mais lenta do que nos pequenos ruminantes, presumivelmente porque os abortos e os partos são menos frequentes (Radostitis *et al.*, 2007).

2.4.2.3 Associados à transmissão de *B. suis*

A resistência no ambiente de *B. suis* não está completamente estudada mas é sabido que a bactéria pode prevalecer viável por 4 a 6 semanas em fezes, urina ou água. A susceptibilidade à infecção parece ser maior nos animais adultos quando comparados com os juvenis, progredindo a infecção na exploração de forma rápida devido às condições de confinamento em que laboram a maioria das explorações sunícolas. Após a primo-infecção não se desenvolve uma imunidade de grupo duradoura sendo as re-infecções frequentes. Aparentemente surge uma resistência aumentada à infecção, mas de curta duração, no período que sucede um episódio agudo (Radostits *et al.*, 2000).

Apesar de transmissível aos bovinos, a *B. suis* não parece transmitir-se entre bovinos, sendo, portanto, a coabitação de animais de ambas as espécies desaconselhada (Kahn & Line, 2005).

2.5 Patogenia da infecção

Após exposição ao agente, este tem a capacidade de penetrar através de superfícies mucosas intactas. Depois de atravessarem a barreira mucosa, aderem a receptores específicos nos macrófagos que fagocitam o agente. As bactérias do género *Brucella spp* sobrevivem e multiplicam-se no interior de células fagocíticas, inibindo a fusão do fagolisossoma (Hirsh & Zee, 1999). No tracto digestivo, o epitélio que reveste as placas de Peyer ao nível do íleo, parece ser o local ideal para a entrada do agente (Hirsh & Zee, 1999). No entanto, nos ruminantes, é a mucosa orofaríngea do aparelho digestivo superior a principal porta de entrada do agente, que é então fagocitado pelos macrófagos, levado para os linfonodos regionais e disseminado pelo restante organismo (Serafino, Conde, Zabal, & Samartino, 2007). As infecções dos linfonodos por *Brucella spp* podem mesmo provocar lise celular e hemorragias num período de 2 a 3 semanas após a infecção (Radostitis *et al.*, 2007).

As bactérias do género *Brucella spp* não possuem factores de virulência óbvios, tais como, cápsulas, fímbrias, flagelos, exotoxinas, exoproteases, ou outras exo-enzimas, citolisinas, formas de resistência, variação antigénica, plasmídeos ou fagócitos lisogénicos. No entanto, foram identificados, nos genomas de *B. suis* e *B. melitensis*, genes que codificam para hemolisinas, adesinas, invasinas, ureases, entre outras proteínas potencialmente virulentas (Gyles, Prescott, Songer, & Thoen, 2004).

2.5.1 Patogenia da infecção por *B. abortus*

A *Brucella abortus* apresenta uma predilecção pelos tecidos do útero grávido, úbere, testículos e glândulas sexuais acessórias, linfonodos, cápsulas articulares e bolsas sinoviais. Numa tentativa de o organismo debelar a infecção as bactérias são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos. Após a infecção, as bactérias encontram-se nos linfonodos que drenam a região de entrada no organismo, disseminando-se posteriormente para outros tecidos linfóides como o baço ou os linfonodos ilíacos e mamários, onde originam lise celular e eventualmente hemorragia dos linfonodos num período de 2 a 3 semanas após a infecção. Esta lesão vascular pode então conduzir à entrada do agente na circulação sanguínea e consequente período de bacteriémia. Se o animal estiver gestante, o agente coloniza e replica nos trofoblastos coriónicos do feto em desenvolvimento. A necrose tecidular resultante desta multiplicação do agente origina o aborto no último trimestre da gestação característico da BB (Radostitis *et al.*, 2007).

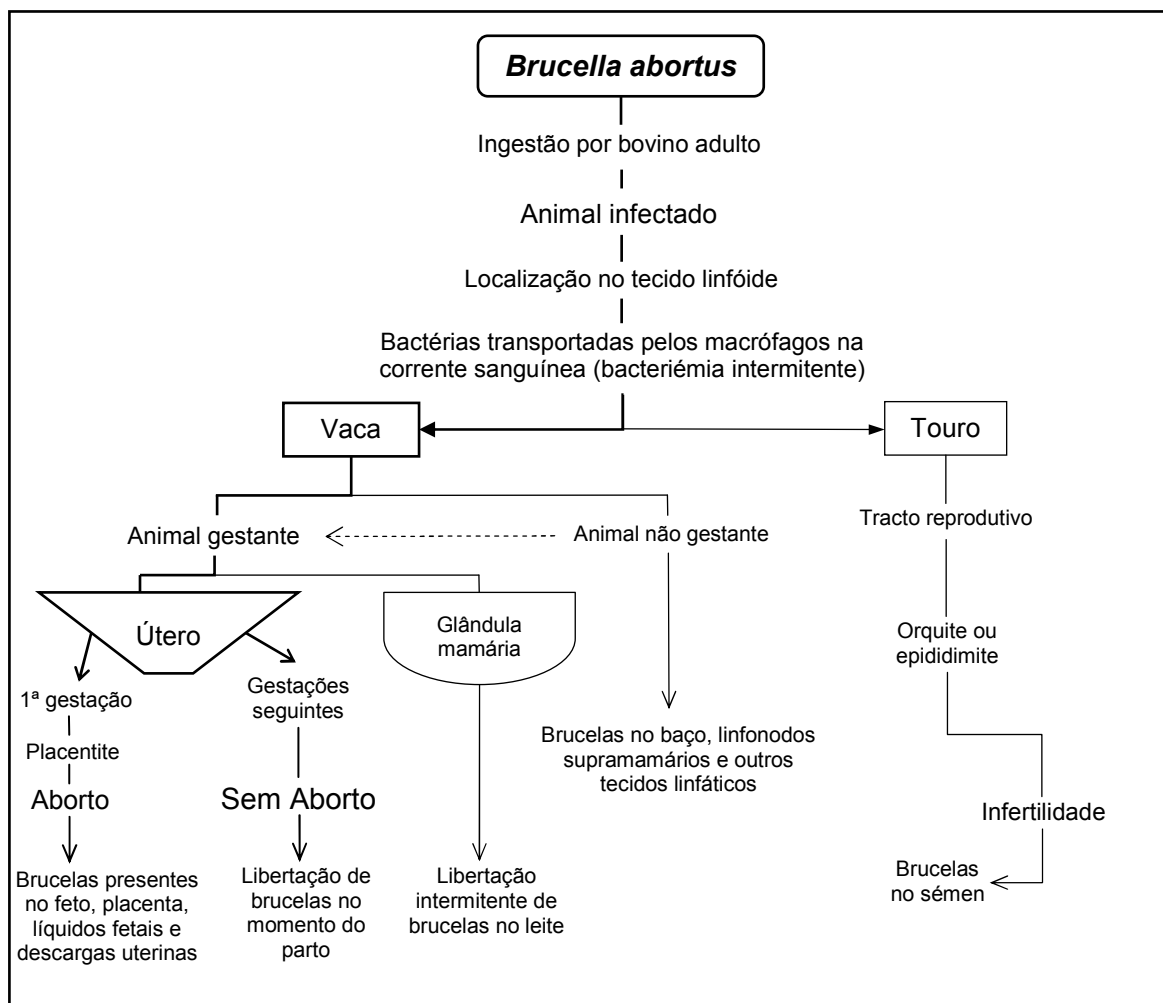


Figura 5 – Progressão da infecção por *B. abortus* em animais adultos susceptíveis. (Adaptado de: Quinn, Markey, Carter, Donnelly, & Leonard, 2002).

2.5.2 Patogenia da infecção por *B. melitensis*

Como nas outras formas de brucelose, a patogenia da infecção depende da localização do agente nos linfonodos, útero e úbere após uma fase inicial de bacteriemia. Esta bacteriemia pode, nos ovinos e caprinos, ser severa ao ponto de produzir reacções sistémicas e possibilitar o isolamento do agente, por cultura, a partir do próprio sangue, durante cerca de um mês (Radostitis *et al.*, 2007).

A localização do agente na placenta conduz a placentite e consequente aborto. Após o aborto, a infecção do útero pode prevalecer por cerca de 5 meses e, na glândula mamária e linfonodos associados, esta infecção pode durar anos. A remissão espontânea pode ocorrer em animais que se infectam num período não gestante. Nos bovinos, a infecção por *B. melitensis* da glândula mamária e linfonodos associados é persistente, com as implicações em termos de saúde pública que podem daqui advir (Radostitis *et al.*, 2007).

2.5.3 Patogenia da infecção por *B. suis*

Após a infecção por *B. suis*, os suínos desenvolvem um período de bacteriemia que pode ultrapassar os 90 dias de duração. Durante e após este período, pode verificar-se a localização de microrganismos viáveis em vários tecidos, nos quais se incluem, os órgãos genitais masculinos ou femininos, ossos, articulações, glândula mamária, linfonodos, baço, fígado, rins e bexiga (Coetzer & Tustin, 2004).

2.6 Sintomas e Lesões

2.6.1 Sintomas e lesões da infecção por *B. abortus*

A duração do período de incubação da BB varia consideravelmente em função da dimensão da dose infectante, da idade e do estado imunitário do animal, apresentando ainda variações consoante o seu sexo. É comumente definido, nesta doença, como o período decorrido entre a infecção e o aborto (Crawford, Huber, & Adams, 1990).

Após a infecção dos linfonodos regionais (que drenam a porta de entrada do agente – normalmente os retrofaríngeos), a disseminação do agente pelos macrófagos dá-se pelos restantes tecidos linfóides (baço e linfonodos ilíacos e supramamários, fundamentalmente). Segue-se um período de latência, a seguir ao qual as bactérias da espécie *B. abortus* apresentam uma predileção pelos tecidos do útero grávido, do úbere, dos testículos, das glândulas sexuais acessórias e das bolsas sinoviais articulares, donde resultam as lesões de placentite necrosante, orquites e higromas articulares, vulgarmente associados à infecção por este agente (Radostits *et al.*, 2007).

Como foi revelado em 1950 por Thomson, em fêmeas que eventualmente abortam, o período de incubação varia com a progressão da gestação. Assim, em vacas que foram infectadas aquando da cobrição, verificou-se que abortavam cerca de 225 dias após esta data, enquanto aquelas que apenas foram infectadas aos 7 meses de gestação abortaram cerca de 50 dias pós-infecção. Nos machos, a definição de um período de incubação é ainda mais complexa uma vez que os resultados serológicos podem ser dúbios e, a progressão da doença, assintomática (Coetzer & Tustin, 2004).

A taxa de abortos numa exploração infectada depende de um conjunto de factores entre os quais se incluem: a susceptibilidade individual ou rácica da fêmea gestante, o tipo de manejo praticado, o grau de severidade da infecção, a qualidade dos pastos ou da alimentação, a densidade animal verificada, o clima ou a topografia da região (Coetzer & Tustin, 2004).

Os abortos ocorrem tipicamente entre o 5º e o 7º mês de gestação mas podem ocorrer antes ou depois deste período. Quando a gestação da fêmea infectada chega a termo, podem surgir animais fracos e que morrem pouco tempo depois do parto. Cerca de 20% dos animais podem nunca abortar, enquanto os outros 80% o fazem apenas uma vez. Nos

machos pode surgir: orquite uni ou bilateral (aguda ou crônica), epididimite ou vesiculite seminal. A circunferência escrotal pode estar normal ou apresentar-se muito aumentada (FAO/WHO, 1986).

Um outro sinal frequente nas explorações onde se deu a introdução da doença e na sequência da infecção dos animais susceptíveis, reside na ocorrência de retenções placentárias e metrites nos casos em que não ocorreu aborto (Radostits *et al.*, 2007).

Em relação às lesões encontradas nos fetos, num estudo onde 25 fetos de bovinos abortados, infectados com *B. abortus* por via natural, foram submetidos a avaliação morfológica, imuno-histoquímica e bacteriológica, concluiu-se que as lesões mais frequentemente encontradas foram as de broncopneumonia e hiperplasia linfóide e linforreticular no fígado e baço. Foram também observadas alterações histológicas nos rins de 9 dos fetos, bem como lesões de meningite granulomatosa em 8 dos casos, 2 deles com infecções severas a este nível (Sözmen M., 2004).

Novilhas nascidas de mães infectadas podem nascer débeis ou ser completamente assintomáticas e permanecer latentemente infectadas até à sua primeira gestação, onde vulgarmente abortam e libertam elevadas quantidades de *B. abortus* para o ambiente (Nicoletti, 1980).

2.6.2 Sintomas e lesões da infecção por *B. melitensis*

O primeiro sinal clínico observável numa exploração de pequenos ruminantes infectados por *B. melitensis* é, frequentemente, um episódio de abortos tardios (durante o último terço da gestação) que afecta uma elevada proporção dos animais. Em alguns casos, particularmente em cabras anãs, podem ocorrer retenções placentárias. Nos machos, a presença de bactérias nos testículos, epididimo e glândulas sexuais acessórias é comum, resultando na incidência de orquites e epididimites e consequente redução da fertilidade, podendo verificar-se a presença de microrganismos viáveis no sémen. As artrites são igualmente frequentes em ambos os sexos (Coetzer & Tustin, 2004).

Nas gestações ulteriores ao episódio abortivo inicial a incidência de abortos tende a reduzir, podendo mesmo deixar de existir. No entanto, os rebanhos podem permanecer infectados durante anos (Biancifiori, Garrido, Nielsen, Moscati, Duran, & Gall, 2000).

Os borregos e cabritos nascidos de fêmeas infectadas podem nascer mais fracos que o habitual ou ser assintomáticos. Pensa-se que podem permanecer como portadores latentes até à idade adulta onde, após atingirem a maturidade sexual, se transformam em agentes disseminadores da doença (Grilló, Barberán, & Blasco, 1997).

Entre as lesões macroscópicas mais comumente observadas nas fêmeas que abortam após a infecção por *B. melitensis* contam-se: o edema, as áreas de necrose de tom

acinzentado nas placentas e a presença de um exsudado vermelho-acastanhado entre o alantocórion e o endométrio (Molello, Flint, Collier, & Jensen, 1963).

Microscopicamente, ocorrem pequenos focos granulomatosos ou necróticos evidentes nos tecidos linfóides, órgãos sexuais e linfonodos associados, bem como nas membranas sinoviais. Nas fêmeas gestantes podem ocorrer extensas zonas de necrose na membrana cório-alantoideia com abundância de bactérias nas vilosidades necrosadas. Podem surgir, no espaço entre as vilosidades e os septos coriônicos, células trofoblásticas descamadas, macrófagos e neutrófilos. Estas lesões placentárias são frequentemente acompanhadas pelas de vasculite e endometrite aguda (Molello *et al.*, 1963).

2.6.3 Sintomas e lesões da infecção por *B. suis*

A infecção por *B. suis* é frequentemente assintomática, podendo haver perda de condição corporal mesmo sem se identificarem lesões específicas. A infecção dos órgãos genitais nas fêmeas pode resultar em ciclos éstricos anormais, nascimento de ninhadas mais pequenas, com leitões mais pequenos e fracos que o normal, ou mesmo abortos que pode ocorrer em qualquer fase da gestação. Os abortos, quando precoces, são vulgarmente sub-diagnosticados ou confundidos com problemas de fertilidade na exploração. O aborto ocorre, usualmente, apenas uma vez em cada fêmea, podendo estas ficar inférteis posteriormente (Coetzer & Tustin, 2004).

Alguns dos leitões que adquirem a infecção *in utero* podem morrer nas primeiras horas de vida, com uma elevada taxa de mortalidade neonatal. Os sobreviventes retêm a infecção até à idade adulta, tornando-se infectantes (Taylor D. J., 1983).

Num estudo onde foram capturados e eutanasiados 80 javalis encontraram-se, num macho, vesículas seminais difusamente aumentadas, fibróticas e com exsudado purulento abundante das quais se isolou *B. suis* (Stoffregen, *et al.*, 2007).

O mesmo estudo revelou que as lesões mais frequentes nos suínos analisados eram as de nefrite intersticial (em 46,3% dos animais capturados), hepatite (42,5%), linfadenite (36,3%) e orquite (26,2% dos machos). Com prevalências inferiores, foram ainda observadas lesões de vesiculite (seminal), prostatite, granulomas renais, fibrose epididimal, necrose placentária e esplenite e endometrite purulentas. A partir dos mesmos exemplares, foram isoladas bactérias do género *Brucella spp.* em 77,5% dos animais. Destes, *B. suis* foi isolada em 88,7% dos exemplares, correspondendo a 68,8% do total da amostra (Stoffregen, *et al.*, 2007).

2.7 Brucelose humana

A brucelose é uma zoonose com elevada importância em saúde pública, também designada por *febre ondulante*, *de Malta*, *mediterrânica* ou *de Gibraltar*. Várias estirpes de diversas

biovares das espécies de *Brucella spp* são efectivamente capazes de provocar doença em humanos, de entre elas destacam-se estirpes pertencentes às espécies: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis* e, principalmente, *B. melitensis*. As espécies *B. neotomae* e *B. ovis* são relativamente inócuas para os humanos (Hugh-Jones, Hubbert, & Hagstad, 1995).

A infecção ocorre da forma descrita para os animais domésticos, ou seja, por contacto directo com fluidos ou secreções de animais infectados, ou aerossóis contendo organismos viáveis (Lütticken, Segers, & Visser, 2007).

Nos países em desenvolvimento a disseminação da doença dá-se fundamentalmente pelo consumo de produtos lácteos não pasteurizados, provenientes de animais infectados e dos quais se desconhece o estado sanitário. A vulgarização da pasteurização dos produtos lácteos e a rejeição, nos matadouros, dos órgãos contaminados, associados à melhoria generalizada dos cuidados de higiene, minimizaram o risco de infecção dos consumidores de produtos de origem animal, outrora tão elevado. Pode ser uma doença ocupacional, que afecta médicos veterinários (MV), funcionários de laboratório, trabalhadores pecuários, trabalhadores da indústria alimentar (os que contactam com leite não pasteurizado, ou trabalhadores da indústria de enlatados que contactam com produtos cárneos) e magarefes. (Hugh-Jones, Hubbert, & Hagstad, 1995).

Os caçadores e participantes em montarias aos javalis (*Sus scrofa ferus*) são considerados um grupo de risco na transmissão aos humanos de *B. suis*. Estão ainda descritas infecções esporádicas de criadores de cães e funcionários de canis, que contactaram com os fluidos amnióticos das cadelas parturientes infectadas por *B. canis* (Hirsh & Zee, 1999).

Os primeiros sinais clínicos surgem após o período de incubação, que pode ir de apenas 5 dias a vários meses, no entanto, são mais frequentes cerca de 2 semanas após se ter verificado a infecção. A sintomatologia pode ser bastante diferente dependendo da estirpe de *Brucella* envolvida e do estado imunitário do paciente. Pode começar abruptamente com arrepios e febre, cefaleias vigorosas, mal-estar e dores generalizadas e, pontualmente, diarreia, ou manifestar-se de forma insidiosa, com um mal-estar ligeiro, com dores musculares, cefaleias moderadas e dor cervical. Seguidamente, surge febre intermitente da ordem dos 40°C durante a noite, que se atenua progressivamente até, na manhã seguinte, se registarem temperaturas próximas dos valores normais e sudação profusa (Berkow, Beers, & Fletcher, 1997).

O quadro clínico descrito dura vulgarmente 1 a 5 semanas e entra em remissão por um período de 2 a 14 dias, durante os quais os sintomas diminuem chegando, em alguns casos, a desaparecer. Este padrão pode ocorrer uma única vez, no entanto, é vulgar a evolução para uma brucelose crónica, onde o paciente experimenta repetidas vagas de febre e remissão durante meses ou mesmo anos. A esta fase inicial, segue-se um quadro clínico que pode incluir: obstipação intensa, anorexia, perda de peso, dor abdominal, dores articulares, cefaleias e dores lombares, fraqueza, irritabilidade, insónia, depressão e

instabilidade emocional. Em determinados casos e numa fase ulterior, podem verificar-se: linfadenomegália generalizada, esplenomegália e hepatomegália (Berkow, Beers, & Fletcher, 1997).

O tratamento da brucelose, que só é permitido nos humanos e não nos animais, passa pela administração de doxiciclina ou de tetraciclinas combinadas, em casos severos, com dihidroestreptomicina, por períodos nunca inferiores a 3 a 4 semanas (Hugh-Jones, Hubbert, & Hagstad, 1995). Apesar de a rifampicina ser um antibiótico de eleição para o tratamento da brucelose humana, nos casos em que se suspeite de infecção com a estirpe vacinal RB51, é contra-indicada a utilização deste antibiótico ao qual o microrganismo vacinal apresenta resistência (Villarroel, Grell, & Saenz, 2000). Nas crianças com menos de 8 anos de idade é aconselhada a utilização da combinação trimetoprim-sulfametoxazol, da estreptomicina ou da rifampicina, para evitar os efeitos secundários das tetraciclinas na dentição dos mais jovens. É importante para a recuperação, nos casos mais severos, o maneio da inflamação com corticosteróides (prednisolona) e a redução das dores musculares com analgésicos potentes, como a codeína ou similares (Berkow, Beers, & Fletcher, 1997).

Nas situações complicadas por meningo-encefalite ou endocardite é advogada a utilização combinada de rifampicina com uma tetraciclina e um aminoglicosídeo (Corbel, 1997).

2.8 Diagnóstico

A informação constante do presente ponto, salvo indicação em contrário, foi baseada no “*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009*”, da OIE.

Para o diagnóstico laboratorial da infecção por *Brucella spp* é frequente a combinação de vários testes incluindo o isolamento bacteriano, os resultados serológicos e os métodos moleculares.

De um modo geral, as provas para a identificação de animais brucélicos podem ser divididas em 4 grupos principais:

- Provas serológicas – nas quais se destacam, o Rosa Bengala (RB), a Fixação do Complemento (FC), os ELISAs (*Enzyme-linked Immunosorbent Assays*) feitas a partir de soro sanguíneo ou de leite e a prova do Anel do Leite (*Milk Ring Test*);
- Provas alérgicas – como a prova da Brucelina;
- Provas bacteriológicas com isolamento do agente;
- Provas moleculares – que permitem a identificação de sequências genómicas específicas das diversas espécies de *Brucella spp*, com a *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

2.8.1 Provas serológicas

2.8.1.1 Rosa Bengala (RB)

O teste de Rosa Bengala é uma prova simples de aglutinação, onde é utilizado antígeno corado com rosa bengala. É um teste de elevada sensibilidade sendo a ocorrência de resultados falso-negativos relativamente rara, o que o coloca como um bom teste para a monitorização de explorações e para garantir a indemnidade da infecção. À semelhança de outras provas serológicas, pode provocar resultados falso-positivos.

2.8.1.2 Fixação do Complemento (FC)

O teste de Fixação do Complemento tem uma elevada especificidade e é amplamente utilizado e aceite como teste de confirmação serológica quando associado a testes como o RB ou ELISA. Existem várias versões deste teste, mas vulgarmente é praticado num formato de micro titulação, com fixação e incubação do soro, antígeno e complemento, a quente (30 minutos a 37°C) ou a frio (a 4°C por 12 a 14 horas).

O teste de FC está indicado para testes de pré-movimentação para o comércio de animais a nível intracomunitário.

2.8.1.3 ELISAs (de soro sanguíneo ou leite)

As provas de ELISA utilizadas no rastreio serológico de animais brucélicos são provas indirectas (i-ELISA). Existem variadíssimos “kits” para a detecção de anticorpos *anti-Brucella* tanto para a utilização no soro sanguíneo, como para a utilização no leite. Estes últimos são mais específicos que a prova do Anel do Leite, evitando a ocorrência de resultados falso-positivos em animais com mastites e em animais em início (colostro) ou fim de lactação.

As provas de i-ELISA que utilizam soro sanguíneo são, à semelhança de RB e FC, altamente sensíveis, estando recomendadas na testagem dos animais para trocas intracomunitárias. Apresentam porém a desvantagem de, em explorações com animais vacinados com vacinas com a B19, apenas poderem ser utilizadas como testes de monitorização e nunca de confirmação, devido à ocorrência de resultados falso-positivos.

2.8.1.4 Anel do Leite (*Milk Ring Test*)

A prova do Anel do Leite é muito utilizada como prova de rastreio serológico massal de BB nas explorações leiteiras.

É uma prova de execução simples, realizada a partir de amostras recolhidas no tanque do leite e pode ser utilizado como teste de rotina para monitorização de BB. Apresenta a limitação de ser pouco sensível em explorações com muitos animais em lactação (mais de 150), uma vez que em casos onde a prevalência é muito reduzida a diluição no leite, torna impossível a detecção de anticorpos *anti-Brucella*. Não são rastreados os animais não-lactantes, não permite identificar a BB nos animais com infecção latente e não se consegue a identificação individual dos animais seropositivos que contribuem para o leite de mistura,

obrigando à execução posterior de controlos serológicos individuais ao efectivo. A existência no efectivo de animais com mastites e de animais em início (coloostro) ou fim de lactação pode levar à ocorrência de resultados falso-positivos.

2.8.2 Provas alérgicas

2.8.2.1 Brucelina

A prova da Brucelina é uma prova alérgica, realizada com um antígeno isento de LPS para evitar reacções inflamatórias inespecíficas. Consiste da medição prévia da espessura da pele no local da inoculação, aplicação intradérmica de uma dose de 0,1 ml de brucelina e leitura após 48 a 72 horas. São considerados positivos os animais com espessamentos cutâneos superiores a 1,5 a 2 mm.

Como apresenta elevada especificidade, os animais serologicamente negativos e não vacinados, que se revelem positivos nesta prova deverão ser considerados como provavelmente infectados. Também é utilizada para a detecção de animais reagentes serológicos falso-positivos nas fases finais dos programas de erradicação. É, no entanto, um teste pouco sensível, pelo que não é recomendado nas testagens de pré-movimentação para trocas intracomunitárias.

2.8.3 Provas para detecção do agente

2.8.3.1 Bacterioscopia e Bacteriologia

Existe uma panóplia de colorações diferentes que podem ser utilizadas na identificação de bactérias do género *Brucella spp.* No entanto, a confirmação da presença de microrganismos deste género não pode ser feita apenas a partir da observação, pois mesmo usando o método modificado de Stamp da coloração de Ziehl-Neelsen (um dos mais aconselhados para o efeito) a diferenciação de *Brucella spp* de outros microrganismos abortivos como *Chlamydophila abortus* ou *Coxiella burnetii*, é extremamente difícil.

O método aconselhado para o isolamento e cultura de bactérias do género *Brucella spp* consiste na sementeira em meio sólido. Existem ainda meios bifásicos dos quais se destaca, pela sua versatilidade, o meio de *Castañeda*, pois permite o isolamento de *Brucella spp* a partir de sangue, fluidos corporais ou leite. A informação relativa à biotipificação tradicional de espécies e biovars de *Brucella spp* pode ser encontrada nas tabelas 3 e 4, da secção 2.3.

2.8.3.2 Provas moleculares

Um complemento à biotipificação pelos métodos referidos na secção anterior foi incluído pela vulgarização da utilização das provas de PCR. A partir da amplificação de fragmentos específicos de ADN e da sua análise por electroforese é possível caracterizar não só a espécie mas também o biovar em presença.

Avanços recentes permitiram ainda, através de técnicas de MLVA (*Multiple Loci Various Number of Tandem Repeats Assay*), caracterizar também o perfil molecular (“bruce”), presente em cada amostra de *Brucella spp*, sendo uma metodologia que permite avaliar a origem do isolado pelo estabelecimento de relações entre isolados distintos em estudos epidemiológicos (Le Flèche, et al., 2006).

2.9 Tratamento

O tratamento da brucelose animal, em Portugal, está expressamente proibido, nos termos do ponto 1, do artigo 5º, do Decreto-Lei 244/2000 de 27 de Setembro.

2.10 Prevenção e Controlo

A prevenção e o controlo da brucelose (bovina ou dos pequenos ruminantes) são as únicas estratégias disponíveis para a limitação das perdas económicas associadas à doença, bem como para a prevenção da transmissão ao Homem (Coetzer & Tustin, 2004).

As informações constantes deste ponto, salvo indicação em contrário, foram baseadas no “Programa de Erradicação da Brucelose dos Bovinos 2010 – Portugal” emitido pela DGV.

2.10.1 Programas de Erradicação de Brucelose (PEB)

A maioria dos países em que a brucelose é endémica possui programas estruturados com o objectivo final de erradicar a doença. Apesar de cada país (ou região) apresentar características específicas que adaptam as medidas a tomar, algumas noções são transversais a todos os PEB e incluem, entre outras medidas, a testagem serológica regular e o abate compulsivo dos animais reagentes e a restrição à movimentação animal com origem ou destino nas explorações afectadas. Alguns prevêm ainda a recorrência a medidas extraordinárias de controlo, como a vacinação massiva dos efectivos presentes em unidades epidemiológicas bem definidas ou regiões endémicas, ou a erradicação pelo abate sanitário total (morticínio) dos efectivos onde se considere existir risco epidemiológico (Radostitis *et al.*, 2007).

2.10.2 Programa de Erradicação de BB para Portugal

Este programa encontra-se regulamentado pelo Decreto-Lei 244/2000 de 27 de Setembro, nomeadamente no que respeita às medidas de profilaxia e polícia sanitária e é co-financiado pela União Europeia.

2.10.2.1 Medidas Gerais

i) Identificação e Movimentação Animal

O Decreto-Lei 142/2006, de 27 de Julho, define os aspectos relativos à identificação, registo e movimentação animal, nomeadamente no que se refere à documentação necessária e institui o Sistema Nacional de Identificação e Registo Animal (SNIRA).

Os detentores de animais devem manter um livro de existências e deslocações actualizado mensalmente, com a indicação do número de animais presentes, bem como registos de todas as entradas e saídas de animais da exploração.

A identificação dos bovinos é obrigatória até aos 20 dias após o nascimento e faz-se pela aposição de 2 marcas auriculares iguais, uma em cada pavilhão auricular, com um número oficial que é único e consta no passaporte individual de cada bovino e é emitido pela DGV, a partir de uma das suas unidades regionais (Direcção de Serviços Veterinários da Região – DSVR – ou pelas DIV).

Do passaporte individual bovino devem constar, para além dos dados relativos à identidade do animal, todas as informações relativas a intervenções de natureza sanitária (rastreios serológicos e vacinações) e a classificação sanitária do efectivo ao qual pertence.

O detentor é obrigado a proceder, no prazo máximo de 4 dias, à notificação de qualquer ocorrência relativa ao seu efectivo (nascimentos, mortes, saídas de animais para exploração em vida ou abate para consumo, ou ainda à notificação da perda de marcas auriculares pelos animais, para emissão de segundas vias).

A movimentação dos animais para exploração em vida encontra-se limitada aos animais provenientes de explorações indemnes (B3) ou oficialmente indemnes (B4), que apenas poderão transitar para explorações com estatuto sanitário equivalente.

Os animais seronegativos, provenientes de explorações não indemnes (B2) só podem sair para abate imediato, para uma exploração de engorda, ou para um centro de agrupamento devidamente autorizado, desde que acompanhados por uma guia sanitária de circulação, emitida pela DSVR, tendo sempre como destino final, o abate.

O trânsito de animais para exploração em vida está, desde 2007, sempre sujeito à realização de testes de pré-movimentação.

Os testes de pré-movimentação consistem das provas serológicas de pesquisa de BB e Leucose Enzoótica Bovina associadas à prova de intradermotuberculização (realizada pelos Médicos Veterinários Executores das Organizações de Produtores Pecuários – OPP) e têm ambos uma validade de 30 dias após a emissão dos resultados. Os resultados dos rastreios periódicos podem também ser utilizados como testes de pré-movimentação desde que a deslocação dos animais se efectue dentro do período de 30 dias após a emissão dos resultados.

Alternativamente, em casos específicos e onde seja possível garantir o isolamento dos animais na exploração de destino, os testes de pré-movimentação podem ser substituídos por testes de pós-movimentação, realizados segundo a mesma metodologia e garantindo que os animais são mantidos em quarentena, só podendo coabitar com o restante efectivo depois de conhecidos os resultados negativos nas provas serológicas e de intradermotuberculinização (DGV, Manual de Apoio à Implementação dos Testes de Pré-Movimentação – no Âmbito dos Programas de Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina, 2009).

ii) **Classificações Sanitárias dos Effectivos Bovinos**

As classificações sanitárias actualmente existentes para as explorações bovinas são:

- B2 – Não Indemne;
- B3 – Indemne (exploração com animais vacinados contra BB);
- B4 – Oficialmente Indemne.

Para além destas classificações sanitárias o *PISA.net*TM (Programa Informático de Saúde Animal) possui ainda as classificações:

- B2.1 – esta classificação é considerada não indemne devendo ser utilizada sempre que se confirme oficialmente a presença de animais infectados (em que nos exames laboratoriais *post mortem* ou outros, tenham sido isoladas e identificadas bactérias do género *Brucella spp*), na exploração em causa;
- B3S – é utilizada sempre que se suspenda a classificação sanitária a um efectivo indemne;
- B4S – é utilizada sempre que se suspenda a classificação sanitária a um efectivo oficialmente indemne.

Nos casos em que haja suspensão do estatuto sanitário (B3S ou B4S) a exploração em questão recuperará o seu estatuto anterior (B3 ou B4, respectivamente) sempre que não ocorram novos animais seropositivos nos dois rastreios subsequentes ao que ditou a suspensão do estatuto. Quando a descida de estatuto é para B2.1, aplica-se a mesma regra que no caso anterior para a subida para o estatuto B2 mas, desta feita, com a obrigatoriedade de permanecer sem novos casos de seropositividade durante mais dois rastreios para a recuperação do estatuto de B3 ou B4.

Para uma melhor interpretação das demais condições que regulam as subidas ou descidas de estatuto sanitário, para cada exploração bovina, estas encontram-se esquematizadas na figura 6.

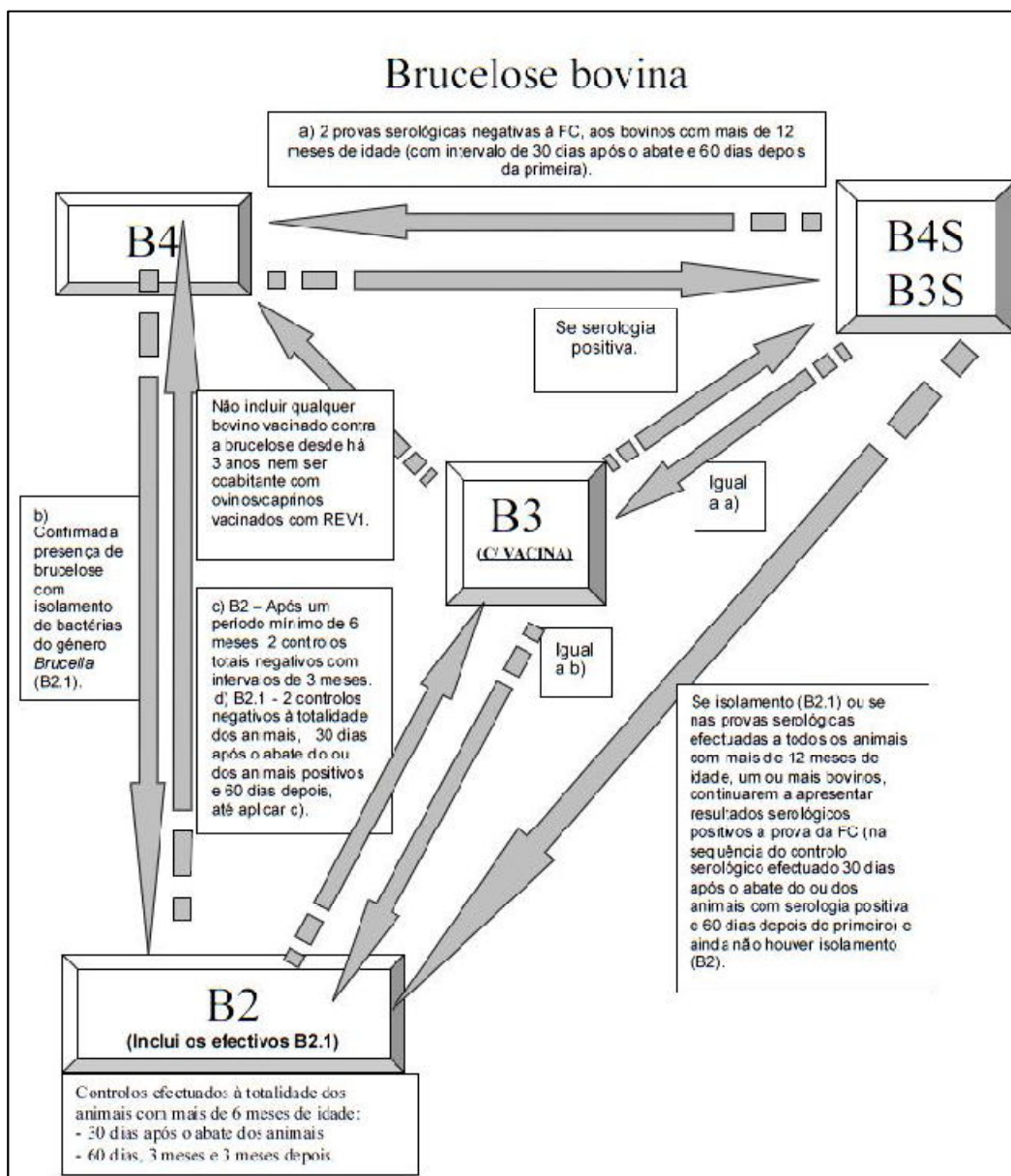


Figura 6 – Esquema simplificado dos critérios para a subida ou descida de estatuto sanitário para as explorações seropositivas e/ou infectadas por BB (Fonte: DGV, 2010).

iii) Rastreios Serológicos (RB, FC, ELISAs de Leite e provas de Anel do Leite)

No controlo serológico efectua-se em primeiro lugar o teste do RB. Qualquer soro positivo ao RB é em seguida submetido o teste da FC. Apenas a positividade à FC determina a positividade do animal.

Para que um efectivo bovino conserve o estatuto de indemne (B3) ou de oficialmente indemne (B4) de brucelose, para além de realizar anualmente um programa de provas e obter resultados negativos, todos os bovinos com mais de 12 meses de idade que entrem no efectivo, provenientes de outro efectivo com estatuto sanitário igual ou superior, deverão apresentar um resultado negativo nos testes de pré-movimentação.

Para os efectivos indemnes e oficialmente indemnes de BB (B3 e B4) presentes em regiões oficialmente indemnes de BB é obrigatório o controlo anual, realizado em todos os animais com mais de 12 meses de idade, utilizando provas serológicas (RB e FC).

Para as explorações indemnes e oficialmente indemnes de BB inseridas em regiões não indemnes (área mínima de uma DIV) está prevista, no programa nacional de erradicação da BB, a realização anual de duas provas serológicas (RB e FC) com um intervalo mínimo de 3 meses e não superior a 12 meses, efectuadas a todos os bovinos com mais de 12 meses de idade. Em zonas definidas como não oficialmente indemnes de BB mas em que todos os efectivos bovinos estejam sujeitos a um programa oficial de combate à brucelose e se a percentagem de efectivos bovinos infectados não for superior a 1%, é possível alterar esta determinação, sendo suficiente realizar uma única prova serológica por ano.

As provas serológicas podem ser efectuadas de um dos seguintes modos:

- Para as explorações de vocação “carne” o controlo serológico pode ser feito da forma anteriormente descrita, consoante o estatuto sanitário e a região da exploração em causa;
- Nas explorações de vocação leiteira o controlo serológico dos efectivos pode realizar-se de um dos seguintes modos:
 - Três provas do anel do leite, realizadas com intervalos de, pelo menos três meses;
 - Três provas de ELISA de leite, realizadas com intervalos mínimos de três meses;
 - Três provas do anel do leite com um intervalo de, pelo menos três meses, seguidas de uma prova serológica, realizada pelo menos seis semanas depois.
- Para os efectivos não indemnes de brucelose (B2) o controlo serológico anual terá de ser realizado em todos os animais com mais de seis meses de idade, com intervalos mínimos de três meses.

iv) **Sequestro sanitário**

Todas as explorações identificadas como seropositivas são colocadas em sequestro sanitário e com estatutos sanitários suspensos (correspondentes aos estatutos B3S ou B4S). O sequestro só é levantado, por determinação da DSVR, quando se tiverem cumprido dois rastreios consecutivos sem animais seropositivos detectados e não tiver ocorrido isolamento do agente a partir do ou dos animais seropositivos inicialmente detectados (neste último caso, há decida de estatuto para B2).

v) **Abates Sanitários**

O abate sanitário é normalmente determinado pela positividade ao teste da FC. Contudo, nos efectivos confirmados como infectados (B2.1), procede-se ao abate dos animais positivos ao RB, desde que se verifique a presença de pelo menos um bovino positivo ao teste da FC. Nos efectivos confirmados como infectados, procede-se também ao abate sanitário de todas as fêmeas com idade inferior a 12 meses de idade, filhas de mães seropositivas a BB.

Os abates sanitários dos animais seropositivos à BB são efectuados sob vigilância das entidades oficiais, o mais rapidamente possível e num período máximo de 30 dias após a data de notificação oficial do proprietário. A marcação dos animais seropositivos e a posterior recolha para abate são efectuadas pelos funcionários das DSVR (ou DIV) ou sob a sua tutela.

O abate sanitário da totalidade do efectivo coabitante de um efectivo positivo ou infectado de brucelose é justificado, em determinadas circunstâncias, numa perspectiva de análise do risco sanitário. Neste contexto, a DSVR pode determinar o abate total do efectivo, com indemnização dos proprietários dos animais expostos ou coabitantes, sempre que ocorram uma ou mais das seguintes condições:

- Não se verifique uma melhoria da classificação sanitária do efectivo ou da unidade epidemiológica nos últimos 12 meses;
- Tenham sido isoladas bactérias do género *Brucella spp*;
- Em certas condições epidemiológicas de uma determinada área geográfica esta a medida for a mais adequada para melhorar a situação;
- Não for possível implementar as medidas de profilaxia e polícia sanitária relativas à unidade epidemiológica em causa.

Após os abates totais dos efectivos, os produtores são obrigados a:

- Cumprir um período de vazio sanitário mínimo de 30 dias, se cumprido durante o Verão, ou de 60 dias se durante o Inverno;
- Realizar a limpeza, desinfeção e desinfestação da exploração e do equipamento no início do período de vazio sanitário;
- Realizar o repovoamento do seu efectivo apenas com animais provenientes de efectivos classificados de indemnes (B3) ou oficialmente indemnes (B4) e com os respectivos testes de pré-movimentação com resultados negativos.

vi) **Rastreios serológicos complementares**

Em todas as explorações onde sejam detectados animais seropositivos a BB é obrigatória a repetição das provas serológicas, a todo o efectivo, 30 dias após a saída da exploração do último animal seropositivo para abate sanitário. Esta situação deve repetir-se sempre que surjam novos casos de seropositividade no efectivo (Figura 6).

vii) Confirmação da Infecção dos Efectivos

A confirmação da infecção nos efectivos suspeitos é sempre realizada por isolamento do agente e sua biotipificação em termos de biovar, pelo LNIV. Podem ser usados órgãos de animais seropositivos recolhidos no matadouro quando é realizado o abate sanitário, ou amostras provenientes dos abortos notificados pelo proprietário.

2.10.2.2 Medidas Complementares

i) Profilaxia Médica

Existe uma proibição da vacinação contra a BB e comercialização livre do respectivo imunogénio em todo o território português, excepto nos casos em que a DGV, por iniciativa própria ou por proposta da DSVR, entenda que factores de ordem sanitária o justifiquem. Durante o período do estágio curricular, existiam 4 programas de vacinação com RB51 em vigência em Portugal: um na região autónoma dos Açores, outro na região de Trás-os-Montes (Montalegre) e dois na região do Alentejo (DIV de Beja e DIV de Elvas).

2.10.3 Programa de Erradicação de BB para a região do Alentejo

O programa de erradicação da BB para a região do Alentejo (2009) constitui uma transposição do programa nacional de erradicação da BB, com a particularidade de estar prevista a vacinação dos efectivos bovinos, com a vacina viva atenuada RB51, em situações específicas, definidas nos planos individuais de saneamento (PIS) (secção 2.10.3.1).

Os requisitos necessários à aplicação de um programa desta natureza encontram-se na directiva europeia: *Guidelines for Brucellosis Eradication Programmes including RB51 or Rev1 cattle vaccination* (SANCO/10245/2003).

Para a instituição de um programa de vacinação em determinada região ou unidade epidemiológica é necessário o comprometimento de todas as partes envolvidas.

2.10.3.1 Planos Individuais de Saneamento (PIS)

Os PIS são protocolos acordados entre os Serviços Veterinários Regionais (SVR), os Médicos Veterinários Coordenadores e Executores das Organizações de Produtores Pecuários (OPP) e os Detentores dos efectivos infectados, nos quais constam as medidas a desenvolver no sentido de controlar a infecção brucélica nos bovinos, prevenir a infecção de outros efectivos, bem como evitar a sua reintrodução após a erradicação. Os PIS não invalidam, no entanto, o cumprimento de todas as medidas ordinárias constantes do programa nacional de erradicação da BB.

Em cada protocolo são estabelecidas as razões que levaram à implementação de medidas extraordinárias, as obrigações de cada uma das partes envolvidas com vista à erradicação da doença e as penalizações previstas no caso de incumprimento por alguma da(s) partes.

Os SVR têm a função de:

- Decidir, na sequência da evolução da situação epidemiológica nas diferentes explorações a necessidade da revacinação das fêmeas adultas, passados 6 a 12 meses;
- Controlar o isolamento dos animais seropositivos até 30 dias após a notificação do produtor e somente proceder ao seu abate sanitário decorrido um período mínimo de 4 semanas após a inoculação da vacina;
- Garantir que os animais da exploração apenas possam ser movimentados com destino ao abate imediato e não para exploração em vida, enquanto não atingirem o estatuto de indemnes (B3) e durante todo o primeiro ano do programa de vacinação;
- Controlar a obrigatoriedade de que as fêmeas adquiridas para repovoamento dos efectivos sejam provenientes de explorações com estatuto sanitário oficialmente indemne de Brucelose Bovina, Tuberculose Bovina, Leucose Enzoótica Bovina e Peripneumonia Contagiosa Bovina (B4T3L4I) e sejam colocadas em quarentena, submetidas a controlo serológico e vacinadas à entrada na exploração. A quarentena deverá manter-se até conhecimento dos resultados das provas de diagnóstico;
- Elaborar inquéritos epidemiológicos e enviar para diagnóstico laboratorial todos os abortos notificados pelo produtor;
- Informar a Direcção Geral de Saúde (DGS) sobre a realização do programa de vacinação com RB51, atendendo à sua resistência à rifampicina e à penicilina.

De entre as obrigações dos Médicos Veterinários Coordenador e Executor da OPP, destacam-se as seguintes:

- Efectuar a colheita de sangue e a vacinação a todos os bovinos do sexo feminino com mais de 4 meses de idade e a recolha de sangue aos machos reprodutores, existentes na exploração;
- Aplicar a dose vacinal de 2ml (correspondente a $1,0$ a $3,4 \times 10^{10}$ UFC de microrganismos da estirpe RB51) por via subcutânea, na tábua do pescoço, independentemente do estado fisiológico de gestação em que as fêmeas se encontrem;
- Não vacinar os machos;
- No primeiro ano de implementação do PIS, revacinar todas as fêmeas jovens vacinadas com RB51 entre os 4 e os 12 meses de idade, 6 a 12 meses depois da primovacinação. Esta acção deve ser efectuada 2 a 3 semanas antes da cobrição, sempre que as características produtivas o permitam;
- Dependendo da evolução da situação epidemiológica na exploração ou unidade epidemiológica, poderá ser decidida, pelos SVR, a revacinação das fêmeas adultas, passados 6 a 12 meses;
- Após a primovacinação de todo o efectivo, efectuada até aos 6 meses após o estabelecimento do PIS e até determinação em contrário da DGV, a OPP vacinará,

anualmente, com uma única aplicação de vacina, todas as fêmeas jovens de substituição nascidas na exploração, com idades compreendidas entre os 4 e os 12 meses;

- Devem ser escrupulosamente respeitados todos os cuidados com a manutenção da vacina em refrigeração (entre os 2 °C e os 7 °C). Após reconstituição (mistura do liofilizado da vacina com o solvente) a vacina deve ser aplicada até às 3 horas seguintes. Devem ser respeitadas todas as condições de assepsia durante a reconstituição e aplicação da vacina. Devem ainda ser tomadas todas as medidas referentes à eliminação, pelos métodos apropriados, de frascos e de todo o material utilizado durante a vacinação, nomeadamente de seringas ou de agulhas descartáveis;
- Efectuar o registo da vacinação e averbamento da data, em cada passaporte de cada bovino;
- Proceder ao registo individual da vacinação no *PISA.net*TM;
- O médico veterinário executor, após a vacinação de cada efectivo, deverá apresentar ao médico veterinário coordenador, um relatório técnico pormenorizado sobre o cumprimento do PIS e enviá-lo, de imediato, aos SVR;
- Enviar aos SVR material dos abortos, para exame laboratorial;
- Reforçar a implementação das medidas de profilaxia sanitária na exploração, comunicando aos SVR qualquer anomalia detectada na realização dos saneamentos;
- Incrementar a sensibilização dos tratadores de animais.

2.10.4 Vacinas disponíveis na prevenção e controlo da brucelose animal

2.10.4.1 Para Bovinos

i) B19

A *Brucella abortus* estirpe 19 (B19) é aquela que mais foi utilizada em todo mundo para prevenção de brucelose bovina *standard* para qualquer vacina posteriormente desenvolvida (OIE, 2009). Foi isolada em 1923 pelo *Dr. John Buck* (Crasta, et al., 2008), a partir do leite de uma vaca de raça *Jersey* como uma estirpe virulenta mas que, após ter sido mantida em laboratório, a temperatura ambiente, durante mais de um ano, se converteu numa estirpe atenuada (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002). A vacina viva atenuada B19 foi utilizada desde o início da década de 30 do século passado como a mais eficaz ferramenta na prevenção da brucelose bovina, só tendo sido substituída já durante a década de 90 pela vacina RB51 (Crasta, et al., 2008).

A estirpe B19 é um microrganismo de morfologia lisa, normalmente incapaz de se multiplicar na presença de eritritol (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002). A imunização com esta estirpe vacinal é tradicionalmente realizada por uma administração única, por via subcutânea, em fêmeas com idade compreendida entre os 3 e os 6 meses, numa dose constituída por $5-8 \times 10^{10}$ organismos viáveis (OIE, 2009).

Esta vacina demonstrou ser capaz de efectivamente induzir protecção nos bovinos vacinados, com taxas de sucesso que flutuavam em função de uma variedade de factores, os quais incluíam: a idade dos animais vacinados, a dose utilizada, a via de administração e o grau de prevalência nas explorações alvo (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002). Apesar da reduzida virulência em bovinos vacinados estão descritas incidências de abortos que variam desde valores inferiores a 1%, até valores que rondam os 2,5%, quando são vacinados animais gestantes. Está também descrita, embora com uma prevalência inferior ao efeito adverso anteriormente descrito, a possibilidade de a vacinação, recorrendo a esta estirpe, poder conduzir ao desenvolvimento de artropatias, com depleção de complexos imunes, contendo antigénio mas não organismos viáveis, nas articulações afectadas (Schurig, Sriranganathan, & Corbel, 2002).

ii) **M45/20**

A estirpe lisa 45/20 de *B. abortus* foi isolada em 1922 e, após 20 passagens sucessivas em porcos da Guiné, foi obtida uma variante rugosa desta estirpe, a qual foi designada por 45/20 (Coetzer & Tustin, 2004). No entanto, a utilização desta estirpe enquanto vacina viva demonstrou não ser viável, uma vez que a estirpe rugosa apresentava pouca estabilidade e convertia-se com assaz frequência numa variante lisa, inviabilizando a sua principal vantagem, a não indução de respostas serológicas nos testes de rotina, só tendo sido utilizada desde então como vacina inactivada (Taylor & Macdiarmid, 1949).

iii) **BS2**

A vacina BS2 é uma estirpe de *B. suis* biovar 1 (estirpe 2) que foi amplamente utilizada como vacina oral no controlo da brucelose bovina na China desde 1971. É também referida como eficiente enquanto vacina para ovinos, caprinos e suínos. Quando administrada oralmente, esta vacina é capaz de induzir protecção contra *B. abortus* de forma segura e sem formação de anticorpos persistentes. No entanto, apesar de ser usada desde há longa data na China, com bons resultados, esta vacina não é recomendada pela OIE (Coetzer & Tustin, 2004).

iv) **RB51**

A estirpe RB51 é uma mutante rugosa, resistente à rifampicina, desenvolvida a partir da estirpe virulenta *B. abortus* 2308, uma estirpe lisa de *B. abortus* biovar 1. Esta estirpe foi

obtida a partir de sucessivas passagens da estirpe virulenta 2308 em *Trypticase* suplementado com agar a 1,5% e concentrações variáveis de rifampicina ou penicilina. As colónias de bactérias da estirpe RB51 revelaram o seu aspecto rugoso pela auto-aglutinação das células em suspensão e pela absorção de cristal-violeta (Schurig, Roop II, Bagchi, Boyle, Buhrman, & Sriranganathan, 1991).

Apesar de produzir baixos níveis da cadeia O do LPS (Cloeckaert, Verger, Granyon, & Grepinet, 1995), num estudo comparativo das respostas serológicas de animais inoculados com as vacinas B19 e RB51, confirmou que a estirpe RB51, contrariamente à B19, não induz seroconversão em bovinos, não tendo sido detectadas reacções positivas nos testes de RB e FC praticados (Poester, Ramos, Gomes, Chiminazzo, & Schurig, 2000). O mesmo estudo revelou ainda que a revacinação das fêmeas adultas, gestantes ou não, não afecta o resultado nas mesmas provas de rastreio serológico.

Os componentes da cadeia O do LPS não foram detectados em estudos de electroforese em agar-gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a partir de LPS extraído de bactérias desta estirpe. Em análises de *Western-blot* recorrendo ao anticorpo monoclonal BRU38, específico para o homopolímero de perosamina (cadeia O) do LPS, foi possível concluir que o LPS desta estirpe é altamente deficiente neste componente, quando comparado com o da estirpe lisa na qual teve origem (2308), ou mesmo com a estirpe rugosa 45/20. Bioquimicamente, esta estirpe retém algumas características da estirpe virulenta da qual derivou, mais concretamente, na capacidade de utilizar eritriol (Schurig *et al.*, 1991).

Não ocorrem reversões para formas lisas, tanto nas passagens *in vitro* como nas passagens *in vivo* (ratos). As respostas serológicas nestes ratos resultaram apenas na produção de anticorpos contra as proteínas membranárias e não contra a cadeia O do LPS, daqui resultando a mais-valia desta estirpe vacinal em programas de erradicação, em contraponto à estirpe B19, no que concerne à diferenciação entre animais vacinados e animais naturalmente infectados, nos testes de rotina utilizados nestes programas (RB e FC). Em ratos imunizados com doses na ordem das 10^8 UFC ficou demonstrado que a estirpe RB51 confere protecção efectiva contra a estirpe virulenta 2308 (Schurig *et al.*, 1991).

As respostas serológicas de bovinos vacinados com doses de 10^{10} UFC da estirpe vacinal RB51 revelaram que esta estirpe não é tão eficiente como a estirpe B19 na indução de títulos de anticorpos às 4 semanas pós-inoculação. No entanto, às 8 semanas o título de anticorpos da B19 decai significativamente, enquanto na estirpe vacinal RB51 se mantém praticamente inalterado. Estes estudos revelaram ainda a persistência de títulos de anticorpos protectores decorrido 1 ano após a vacinação experimental (Olsen, Stevens, Cheville, & Schurig, 1997).

2.10.4.2 Para Pequenos Ruminantes

i) Rev 1

A vacinação de ovinos e caprinos com a vacina viva atenuada *B. melitensis* Rev 1, desenvolvida por Elberg em meados da década de 50 do século passado é considerada como uma forma prática e eficaz de reduzir a incidência de brucelose dos pequenos ruminantes (Coetzer & Tustin, 2004).

Apesar de ser utilizada como vacina viva atenuada, a estirpe Rev 1 detém alguma patogenicidade residual, podendo causar: aborto se inoculada em fêmeas gestantes, ou presença de microrganismos viáveis no leite se a aplicação tiver lugar durante o período de lactação. Para prevenir estas reacções adversas a vacinação subcutânea é apenas praticada em animais juvenis sendo as fêmeas adultas vacinadas por via intraconjuntival com uma aplicação simples de uma dose reduzida (10^9) desta mesma estirpe (Aitken, 2007). Outro dos inconvenientes desta estirpe vacinal prende-se com o facto de, após a vacinação dos animais, os títulos de anticorpos que interferem com as provas serológicas de FC se manterem por pelo menos 6 a 8 semanas pós-vacinação, o que impossibilita novo rastreio serológico eficaz, sem risco de identificar animais vacinados como seropositivos por infecção natural. Com o objectivo de contornar esta situação, foi desenvolvida uma estirpe mutante de Rev 1, sem o gene BP26 (que codifica uma proteína periplasmática) e que, segundo os estudos praticados em ratos, permitiria a diferenciação serológica entre animais vacinados e animais naturalmente infectados (Cloeckaert, Jacques, & Grilló, 2004). Esta vacina requer, no entanto, que testes de segurança e eficácia sejam praticados nas espécies-alvo para que possa ser incluída no arsenal imunológico disponível para a erradicação da brucelose nos pequenos ruminantes.

ii) H-38

A vacina da estirpe H-38 é produzida a partir de uma estirpe virulenta de *B. melitensis* Biovar 1, inactivada com formaldeído e suspensa em óleo adjuvante (*Arlace/ A*). É vulgarmente aplicada numa dose de 3×10^{11} microrganismos inactivados e é capaz de induzir uma boa protecção que pode durar até 15 meses. No entanto, esta estirpe vacinal apresenta duas desvantagens em relação à Rev 1: a resposta à vacina em termos de formação de anticorpos é mais lenta e, com relativa frequência, observam-se reacções severas no local de inoculação (Aitken, 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objectivo de facilitar a leitura e a interpretação das informações adiante apresentadas, o presente capítulo está organizado de acordo com a seguinte estrutura:

- Na secção 3.1 apresentam-se as descrições dos materiais utilizados para a obtenção dos dados, bem como uma descrição sumária das metodologias de compilação, análise e apresentação dos resultados obtidos;
- Na secção 3.2 é feita uma breve descrição das explorações pecuárias alvo, bem como uma caracterização da região na qual se inserem. Para esta caracterização são apresentados dados relativos ao número de animais saneados e à prevalência de BB, calculadas para as explorações e para os animais seropositivos;
- Na secção 3.3 é apresentado o protocolo de vacinação dos efectivos bovinos das explorações alvo deste estudo, segundo o acordado no PIS.

3.1 Recolha e processamento dos dados

3.1.1 Inquérito Epidemiológico (IE)

Para a obtenção das informações relativas às explorações pecuárias constantes desta dissertação foram realizadas deslocações aos locais, com o intuito de se avaliar quais os factores de risco existentes em cada uma delas para a transmissão de BB. Para tal foram realizados IE aos detentores (ou funcionários por eles delegados para o efeito) e MVA utilizando o modelo oficial da Direcção Geral de Veterinária (DGV) utilizado pelos serviços oficiais nas situações de suspeita ou de foco de BB (Anexo 1).

Este modelo de IE é constituído por 3 secções principais que visam, fundamentalmente, a caracterização das explorações pecuárias, o esclarecimento da origem da infecção e a avaliação da situação em termos do risco de alastramento da doença.

A primeira secção do IE está dividida em 3 subsecções. Na primeira subsecção, são recolhidas as informações relativas à caracterização genérica da exploração, nomeadamente, em relação à identificação do proprietário, à constituição do efectivo bovino e à identificação do Médico Veterinário Assistente (MVA) da exploração. Na segunda subsecção, é realizada uma caracterização sanitária da exploração em questão, onde é possível recolher informações relativas à existência de sintomatologia de BB, mais concretamente, se ocorreram abortos ou outros problemas de fertilidade nas fêmeas reprodutoras ou existiram situações de mortalidade neonatal. Na terceira subsecção, pretende-se esclarecer a origem provável da infecção, avaliando os eventuais contactos do efectivo bovino analisado com animais de explorações vizinhas ou do mesmo detentor, através do controlo da movimentação animal com destino ou origem na exploração analisada e a identificação do transportador habitual. Também se avalia a partilha de equipamentos ou alfaías agrícolas com outras explorações e ainda o tipo de manejo

reprodutivo praticado na exploração, assim como a história prévia de BB na exploração em questão e são recolhidas as opiniões do detentor e MVA acerca da origem provável da infecção.

Na segunda secção do IE existem questões que visam uma caracterização da exploração, fundamentalmente, no que respeita à aptidão produtiva, ao regime de produção, ao maneo alimentar dos animais, às condições para o isolamento dos animais (principalmente no período do parto), à presença de cães pastores e às condições globais de higiene encontradas, entre outros.

Na terceira e última secção do IE é avaliada a eventual existência de outras explorações epidemiologicamente relacionadas. Para este ponto do IE contribuem as informações relativas a outras explorações do mesmo detentor, a explorações com relações comerciais (de compra ou venda) de animais com a exploração inquirida e também questões relativas às explorações com relações geográficas de proximidade (contíguas ou não) e respectivo estatuto sanitário.

3.1.2 Recolha e análise das informações sanitárias das explorações

Para uma completa caracterização das explorações avaliadas, à informação do IE foi ainda necessário acrescentar as informações compiladas na DIV de Elvas relativa aos estatutos sanitários, aos rastreios serológicos, às provas de pesquisa bacteriana e à introdução de animais, recolhidas de acordo com a metodologia seguidamente explicitada.

Quanto às informações sanitárias, referentes a cada uma das explorações pecuárias inseridas no estudo, estas foram maioritariamente retiradas do Programa Informático de Saúde Animal (*PISA.net*TM) utilizado pela DGV para a manutenção de uma base de dados (BD) com todo o histórico sanitário das explorações a nível nacional, sendo as BD actualizadas automaticamente, pelo simples recurso a uma ligação à *internet*. Esta é a terceira versão de um programa informático de gestão de BD existente desde a década de 90 e que já contou com duas versões anteriores, *PISA.dos*TM e *Pisa.win*TM, que apresentavam a lacuna de a BD ter de ser actualizada em suporte físico.

Uma vez que o *PISA.net*TM não permite a exportação dos dados num formato electrónico que permita que sejam directamente trabalhados (Figura 7), todas as informações sanitárias recolhidas (listagens em papel) foram posteriormente introduzidas numa BD criada pelo autor, utilizando o *software Microsoft*[®] (MS) *Office*TM 2003: *Access*TM (ficheiro em formato “.mdb”), de forma a facilitar tanto a consulta como a análise dos dados.

As informações adicionais, relativas a pesquisas laboratoriais para isolamento do agente causal, foram obtidas por consulta directa dos resultados em papel nos arquivos da DIV de Elvas, relativos a cada uma das explorações estudadas e esta informação foi posteriormente incorporada na referida BD.

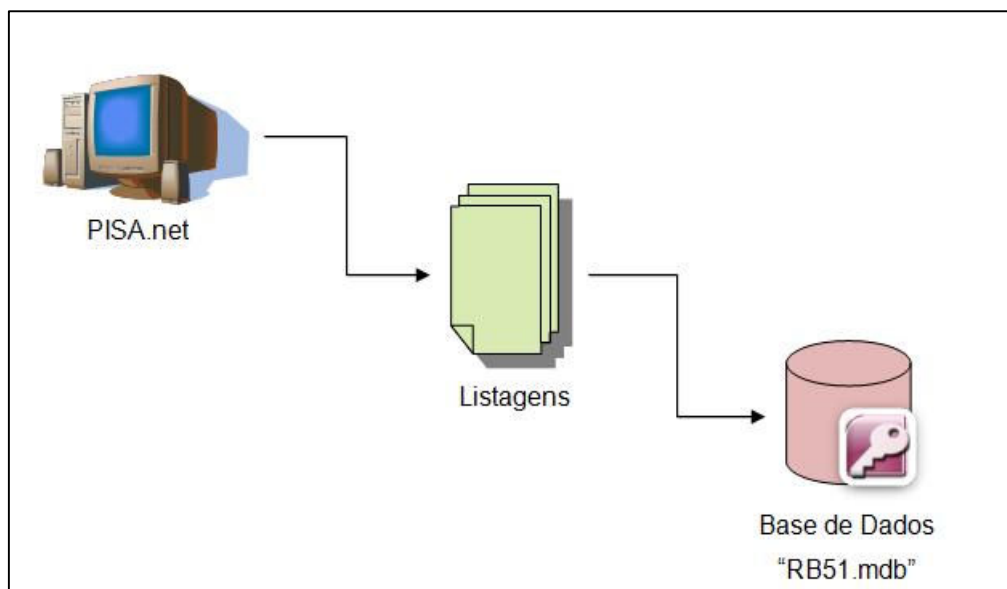


Figura 7 – Fluxograma representativo da metodologia aplicada na construção da BD.

3.1.3 Georreferenciação das explorações

Para a recolha das coordenadas no terreno dos pontos limítrofes das explorações, necessárias à georreferenciação das unidades de produção, foi utilizado um *Global Position System* (GPS), modelo *Amaryllo Trip Tracker*® (Figura 8).

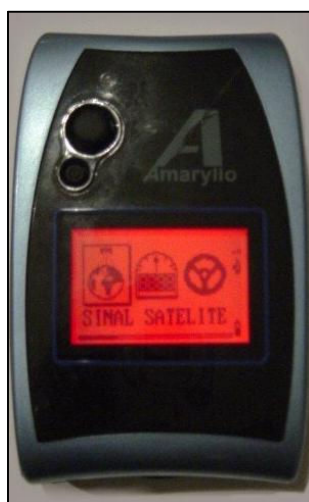


Figura 8 – GPS utilizado no terreno para recolha de coordenadas dos pontos limítrofes das explorações alvo.

Esta actividade prendeu-se fundamentalmente com o facto de a DIV de Elvas não possuir os dados do “parcelário” das explorações pecuárias em questão. Estes dados existem para todo o país e foram recolhidos pelo extinto INGA (Instituto Nacional de Intervenção e Garantia Agrícola), organismo hoje incorporado no IFAP (Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas).

3.1.4 Software

Com o objectivo de avaliar epidemiologicamente as informações geográficas e criar uma forma intuitiva de apresentação de alguns dos resultados foi ainda utilizado o *gvSIG*®, um *software* de Sistemas de Informação Geográfica (SIG), disponibilizado gratuitamente na rede pela *Generalitat Valenciana*, no endereço: www.gvsig.gva.es. Para tal, foi necessário proceder à conversão das coordenadas obtidas no terreno, utilizando o *software Microsoft*® (*MS*) *Office*™ 2007: *Excel*™, num formato comportável pelo *gvSIG*® (Figura 9).

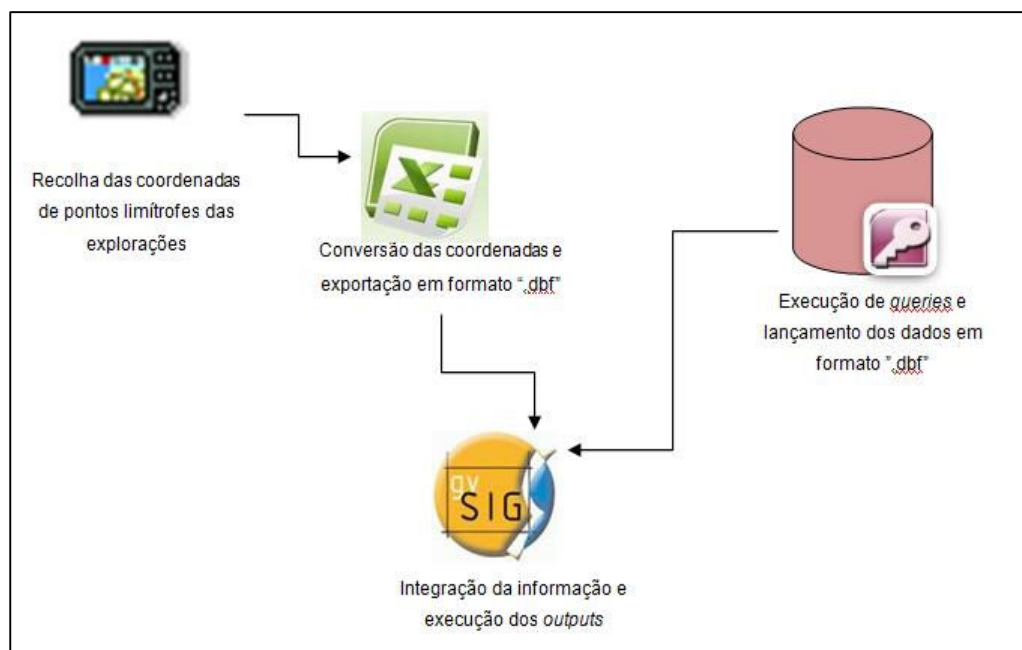


Figura 9 – Fluxograma representativo da metodologia de análise e interpretação dos dados e ilustração das conclusões.

Também para que os dados constantes da BD criada pelo autor pudessem ser exportados para este programa de informação geográfica foi necessário ainda convertê-los no formato “.dbf” uma vez que se trata de um programa de utilização livre (*open source*) e não comporta definições de proprietário como o formato “.mdb” em que a BD foi originalmente construída (Figura 9).

3.2 Objecto de Estudo

3.2.1 Descrição das Explorações Alvo

As 7 explorações pecuárias de bovinos inseridas neste estudo encontravam-se na área de intervenção da DIV de Elvas: 2 explorações no Concelho de Elvas, 3 em Monforte, 1 em Arronches e 1 em Sousel (Figura 10).

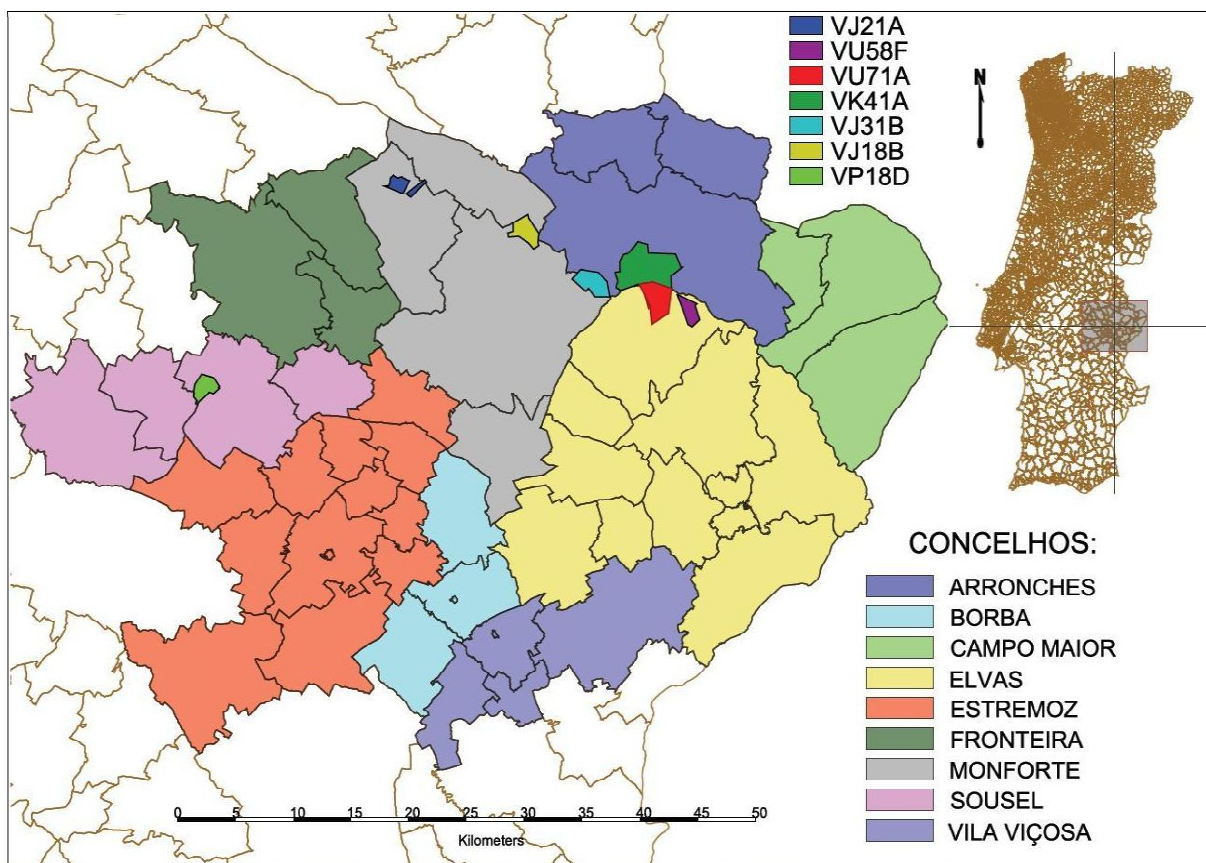


Figura 10 – Concelhos pertencentes à área de intervenção da DIV de Elvas e localização das explorações bovinas incluídas na avaliação epidemiológica (Mapa original).

As explorações em questão, adiante também designadas pela marca oficial de exploração (MOE), são as seguintes:

- Herdades de Gaspar e Mareares, com a MOE VJ31B, situada na Freguesia de Monforte, Concelho de Monforte;
- Herdade do Baldio, com a MOE VK41A, situada na Freguesia de Assunção, Concelho de Arronches;
- Herdade da Almeida Nova, com a MOE VU58F, situada na Freguesia de Santa Eulália, Concelho de Elvas;
- Herdade da Casa das Vacas, com a MOE VU71A, situada na Freguesia de Santa Eulália, Concelho de Elvas;
- Herdade da Amoreira, com a MOE VJ18B, situada na Freguesia de Assumar, Concelho de Monforte;
- Herdades de Muacho e Gamito e de Cantos, com a MOE VJ21A, situada na Freguesia de Vaiamonte, Concelho de Monforte;
- Herdade da Saianda, com a MOE VP18D, situada na Freguesia de Sousel, Concelho de Sousel, e a única das referidas, constituída por bovinos de aptidão leiteira.

As designações sociais dos detentores das referidas explorações pecuárias foram mantidas confidenciais.

3.2.2 Caracterização da Região

A região de intervenção da DIV de Elvas abrange os concelhos de: Arronches, Borba, Campo Maior, Elvas, Estremoz, Fronteira, Monforte, Sousel e Vila Viçosa.

No período analisado (1 de Janeiro de 2008 e 17 de Julho de 2009)¹ os concelhos supracitados apresentavam os dados populacionais médios registados na Tabela 5 em relação aos efectivos bovinos saneados.²

Tabela 5 – Efectivo bovino médio nos concelhos abrangidos pela DIV de Elvas no período de 1 de Janeiro de 2008 a 17 de Julho de 2009.

Concelhos	Nº de freguesias com explorações bovinas	Nº de explorações bovinas	Nº médio de bovinos saneados	Efectivo reprodutor médio
Arronches	3	86	14270	165,9
Borba	3	23	1910	83,0
Campo Maior	3	38	5460	143,7
Elvas	11	141	29260	207,5
Estremoz	11	74	7180	97,0
Fronteira	3	40	6170	154,3
Monforte	4	122	23500	192,6
Sousel	4	35	4600	131,4
Vila Viçosa	5	35	6220	177,7
Total	47	594	98570	150,4

Dos 9 concelhos analisados, o de Elvas apresentava, no referido período, o número mais elevado de bovinos, contando com um efectivo bovino total próximo dos 30 mil bovinos com idade superior a 1 ano. Era simultaneamente neste concelho que existia o maior número de explorações bovinas (141), distribuídas por 11 freguesias.

Ao concelho de Elvas seguiam-se, em termos do número médio de bovinos saneados, os concelhos de Monforte e Arronches. De facto, o número de bovinos encontrados nestes 3 concelhos correspondia a 68% do total de animais saneados na região, revelando a

¹ Esta delimitação cronológica prendeu-se, por um lado, com o facto de para datas anteriores ao ano de 2008 o PISA.netTM não apresentar, para esta região, dados fiáveis em todos os campos informativos analisados e estendeu-se até 17 de Julho de 2009, data em que o autor terminou o período de estágio curricular decorrido na DIV de Elvas.

² Apenas foram contabilizados os bovinos saneados neste período, ou seja, os valores dizem respeito apenas aos animais com idade superior a 1 ano e com, pelo menos, um controlo serológico efectuado antes ou durante o referido período. Os valores apresentados correspondem aos valores médios no referido período.

importância do sector da produção bovina nestes 3 concelhos. Esta situação pode ser explicada pelo tipo de terrenos encontrados nestes concelhos, constituídos fundamentalmente por montado de sobro e azinho e extensas pastagens, que proporcionam boas condições à produção de bovinos de carne em regime extensivo com os animais “a campo” durante todo o ano. Esta era, de resto, a tipologia da maioria das explorações visitadas pelo autor nesta região, à excepção do concelho de Elvas, no qual existiam algumas explorações bovinas de vocação leiteira.

No extremo oposto encontrava-se o concelho de Borba, com apenas 23 explorações bovinas e com um efectivo bovino saneado médio de 83 animais. Esta situação devia-se sobretudo ao facto de, na região sudoeste da área de intervenção da DIV de Elvas em que este concelho se insere, apesar de a produção animal ocupar um papel preponderante na economia da região, abundarem as explorações de pequenos ruminantes de vocação leiteira. Tal situação devia-se à tradição desta região (Sousel, Borba e Estremoz) na produção de queijos a partir de leite de pequenos ruminantes, predominantemente, de ovelha.

No mesmo período foi também analisado o efectivo bovino total médio (em termos de animais saneados) para cada freguesia de cada um destes concelhos (Figura 11).

Nesta análise destacou-se claramente, em termos do número médio de bovinos saneados, a freguesia de Monforte, concelho de Monforte, com um total de 13120 animais distribuídos por 63 explorações bovinas. Seguiram-se, com valores acima dos 5000 bovinos saneados as freguesias de Assunção, concelho de Arronches, com 7021 animais distribuídos por 44 explorações e a freguesia de Santa Eulália, concelho de Elvas, com 5052 animais distribuídos por 18 explorações bovinas.

Em contraponto, as freguesias urbanas de Santa Maria de Estremoz, concelho de Estremoz, São Bartolomeu, concelho de Borba e a freguesia rural de Glória, concelho de Estremoz, não possuíam nenhuma exploração bovina registada e, consequentemente, nenhum bovino saneado no período analisado.

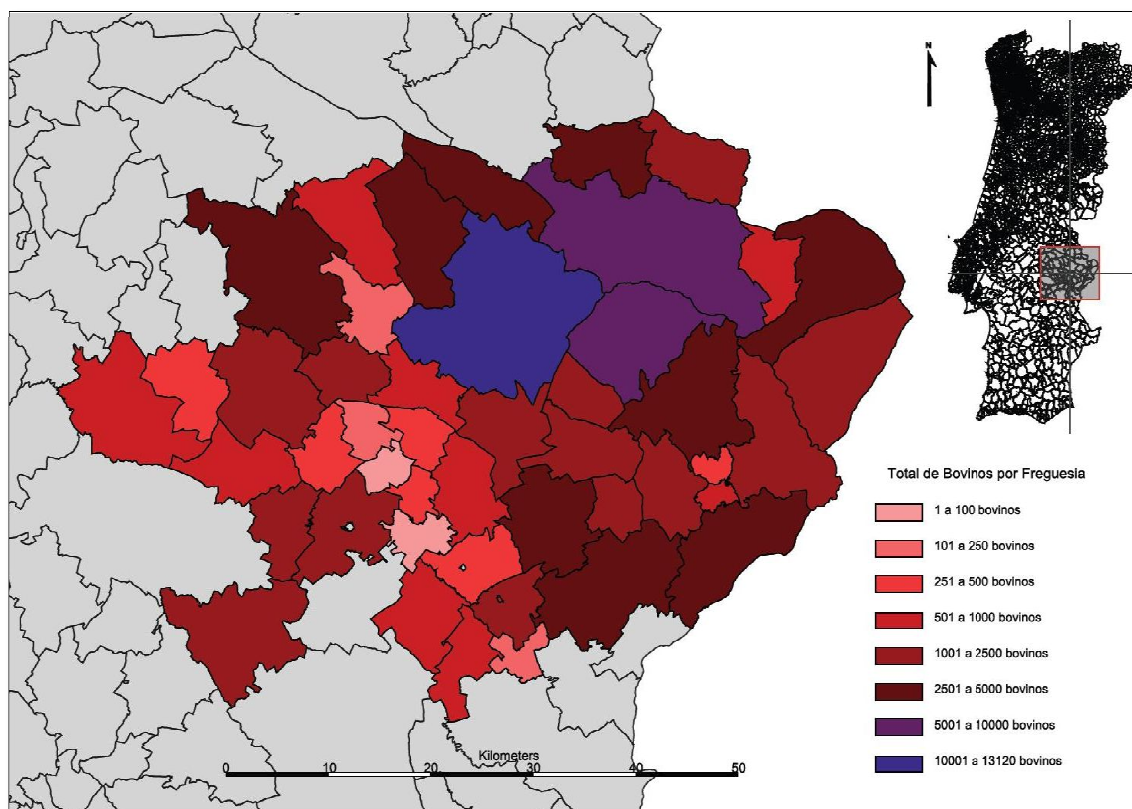


Figura 11 – Número total médio de bovinos saneados, por freguesia, no período compreendido entre 1 de Janeiro de 2008 e 17 de Julho de 2009 (Mapa original).

Foram também calculadas as prevalências de explorações seropositivas (Figura 12 e Figura 13) e de animais seropositivos (Figura 14 e Figura 15) para BB no ano de 2008 e no período de 1 de Janeiro a 17 de Julho de 2009. As prevalências de BB por freguesia foram calculadas segundo as seguintes fórmulas para cada um dos períodos estudados:

- $Pe = \frac{n^{\circ} \text{ de explorações seropositivas}}{n^{\circ} \text{ total de explorações controladas}} \times 100$, onde Pe representa a prevalência de BB, por freguesia, em termos de explorações seropositivas;
- $Pa = \frac{n^{\circ} \text{ de bovinos seropositivos}}{n^{\circ} \text{ total de bovinos rastreados}} \times 100$, onde Pa representa a prevalência de BB, por freguesia, em termos de bovinos seropositivos.

Um dos objectivos desta segmentação cronológica foi o de evidenciar a evolução da prevalência de BB verificada nas freguesias analisadas, dado que a vacinação contra a BB com RB51 foi iniciada, na maioria das explorações, no último terço do ano de 2008.

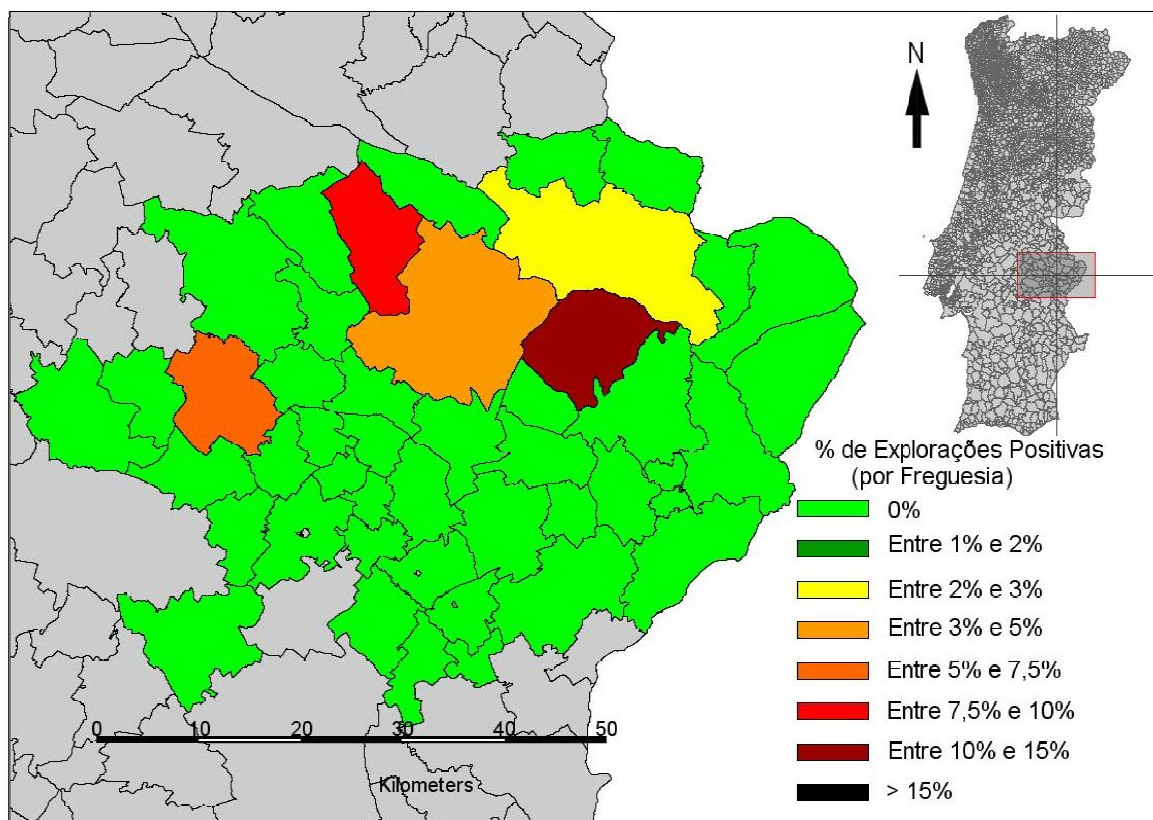


Figura 12 – Prevalência de explorações com bovinos seropositivos por freguesia no ano de 2008 (Mapa original).

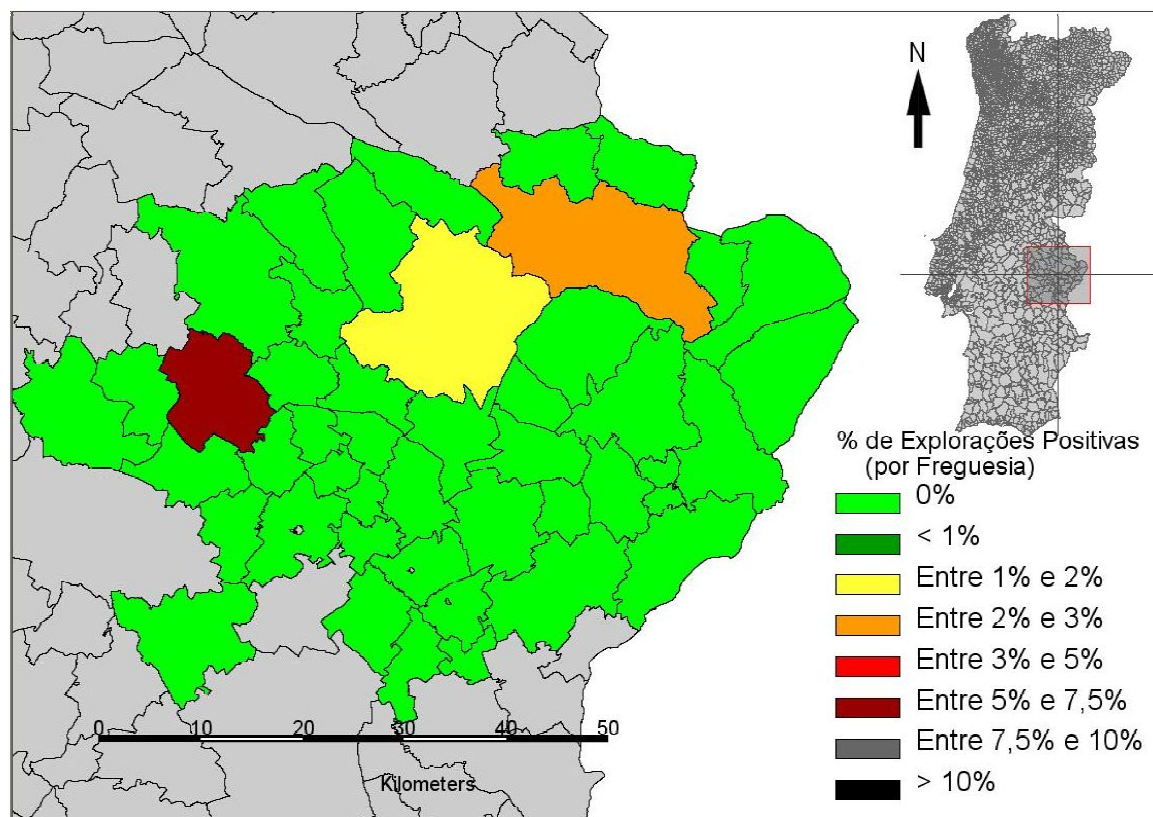


Figura 13 – Prevalência de explorações com bovinos seropositivos por freguesia no período compreendido entre 1 de Janeiro e 17 de Julho de 2009 (Mapa original).

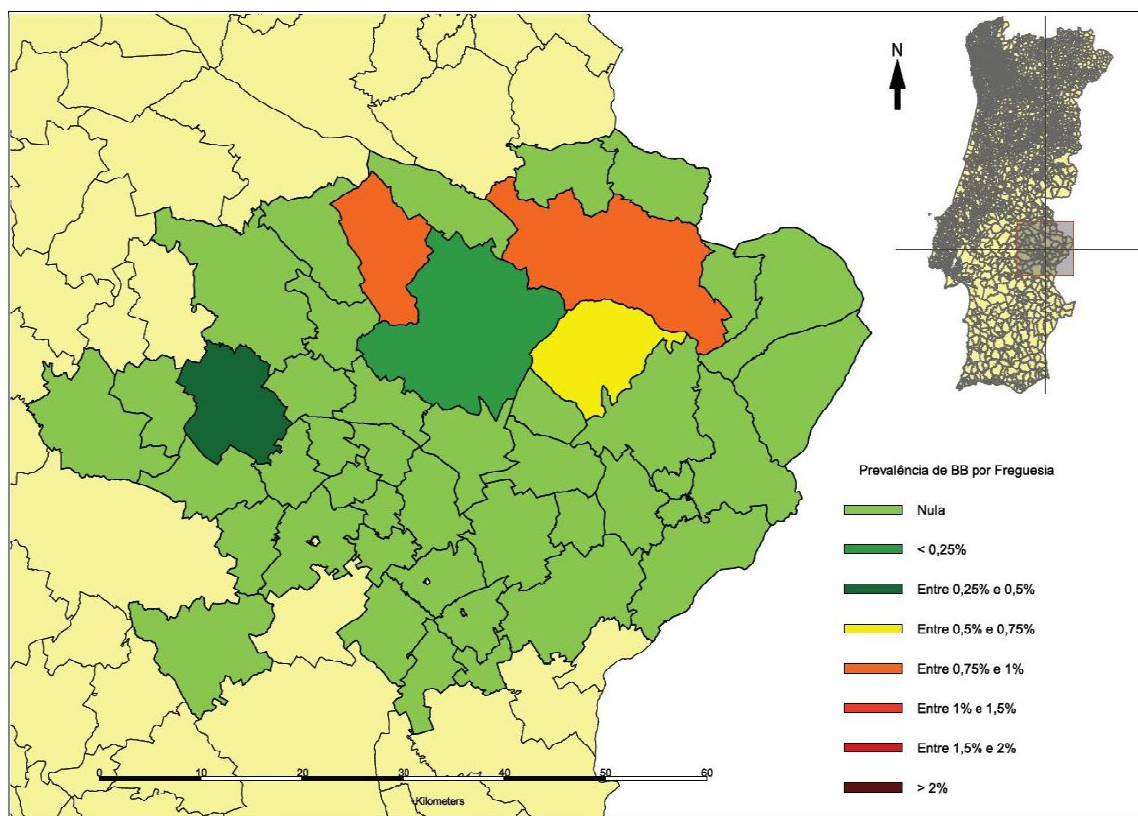


Figura 14 – Prevalência de bovinos seropositivos por freguesia no ano de 2008 (Mapa original).

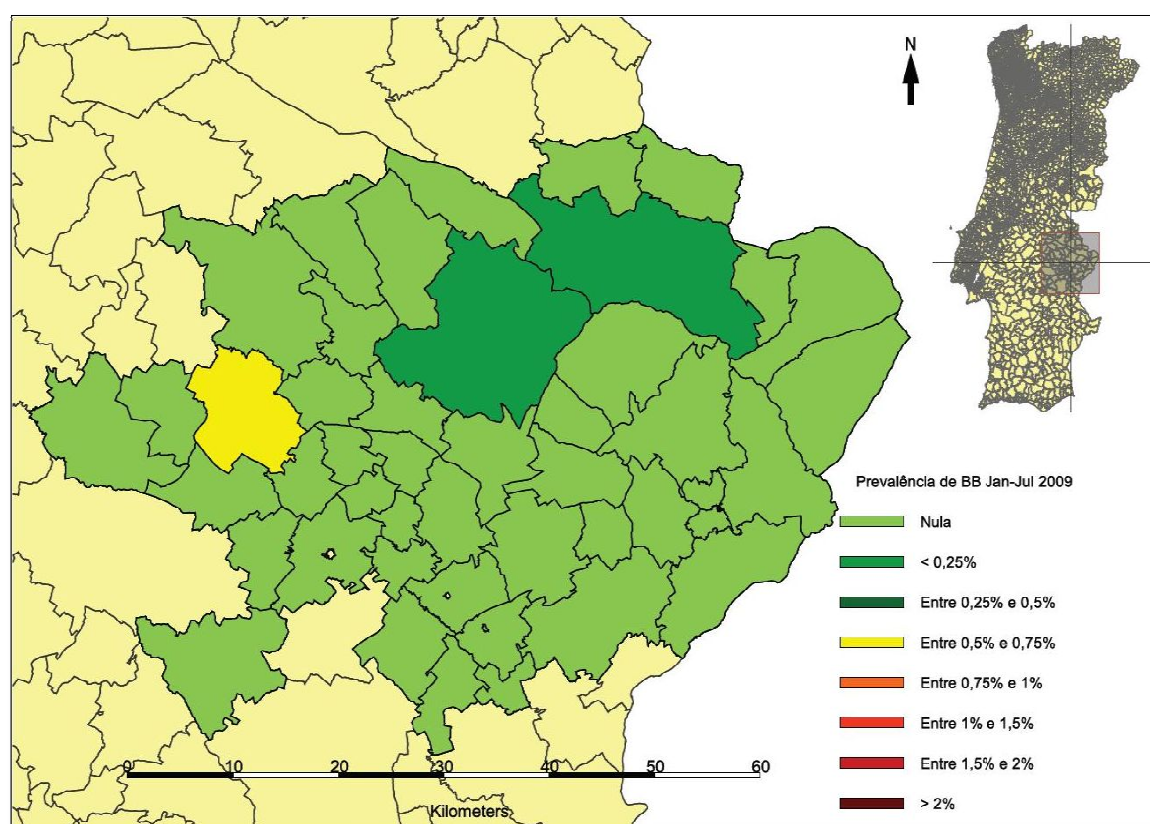


Figura 15 – Prevalência de bovinos seropositivos por freguesia no período compreendido entre 1 de Janeiro e 17 de Julho de 2009 (Mapa original).

3.3 Vacinação

A vacinação dos animais presentes nas explorações incluídas nesta avaliação epidemiológica foi realizada pelos respectivos MVA.

Foi utilizada a vacina viva atenuada RB51[®]CZV dos laboratórios CZ Veterinária, S.A. (Figura 16), constituída por 1,0 a 3,4x10¹⁰ UFC viáveis por dose de 2 ml, aplicada por via subcutânea na tábua do pescoço (Figura 17), a todas as fêmeas com mais de 4 meses de idade, independentemente do estado fisiológico de gestação em que estas se encontravam.



Figura 16 – Vacina utilizada na campanha de vacinação (Disponível em: <http://www.czveterinaria.com/es/productos/rb-51.html>)



Figura 17 – Técnica de vacinação das novilhas da exploração VU58F (Fotografias originais).

Procedeu-se ainda, 6 a 12 meses depois, à revacinação de todas as fêmeas com idades compreendidas entre os 4 e os 12 meses de idade, à data da primovacinação.

Todas as fêmeas eventualmente introduzidas a partir da data do início da vacinação nas explorações em questão, bem como todas as fêmeas entretanto nascidas e que se destinavam a ser utilizadas como reprodutoras, viriam a ser também vacinadas de acordo com o mesmo protocolo vacinal. No caso das fêmeas adquiridas noutras explorações estas teriam de ser, obrigatoriamente, provenientes de explorações com estatuto sanitário B4T3L4I, vacinadas à entrada na exploração, submetidas a controlo serológico e colocadas em quarentena até conhecimento dos resultados das provas de intradermotuberculinização e serológica negativas, só então podendo ser introduzidas no restante efectivo. Esta foi a solução encontrada pela DGV pela impossibilidade de vacinar estes animais na exploração de origem.

As primovacinações dos diversos efectivos das explorações descritas decorreram no período compreendido entre 3 de Setembro de 2008 e 11 de Fevereiro de 2009, nas datas indicadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Efectivos bovinos vacinados com RB51.

Exploração	Data da primovacinação	Nº de animais vacinados	Data da revacinação	Nº de animais revacinados
VJ31B	09-09-2008	152	15-05-2009	15
	11-09-2008	91		
	18-09-2008	14		
	27-10-2008	42		
	05-12-2008	1		
VK41A	18-09-2008	200	-	-
	01-10-2008	201		
VU58F	05-09-2008	180	20-05-2009	22
VU71A	15-09-2008	197	16-04-2009	28
	23-09-2008	196		
VJ18B	03-09-2008	214	-	-
VJ21A	06-09-2008	273	-	-
	18-11-2008	40		
VP18D	11-02-2009	196	-	-
Nº Total de Bovinos		1997		65

À data de recolha das informações relativas à vacinação e revacinação dos efectivos analisados (17 de Julho de 2009) apenas 65 animais, correspondentes a cerca de 3,25% do total de animais primovacinados, haviam recebido a segunda dose de vacina.

De referir, a respeito da vacinação, que o programa instituído tem uma duração mínima de 5 anos e estender-se-á a mais explorações da região se assim se justificar.

4. RESULTADOS

Durante as visitas efectuadas pelo autor às explorações VJ31B, VK41A, VU58F e VU71A tornou-se claro que estaríamos perante uma unidade epidemiológica (UE) única, situação constatada quer pela tipologia e aptidão das referidas explorações, quer pela proximidade geográfica, que permite o contacto dos animais nas pastagens junto às zonas de vedação, quer ainda pela partilha de acessos verificada entre estas explorações.

As restantes 3 explorações apresentam características que não as relacionam geograficamente ou que apresentam sistemas produtivos diferentes.

Esta situação justificou uma abordagem da avaliação epidemiológica em termos de UE tendo-se agrupado as 7 explorações alvo do seguinte modo:

- Unidade epidemiológica 1 (UE1) – constituída por 4 explorações (VJ31B, VK41A, VU58F e VU71A);
- Unidade epidemiológica 2 (UE2) – constituída pela exploração VJ18B;
- Unidade epidemiológica 3 (UE3) – constituída pela exploração VJ21A;
- Unidade epidemiológica 4 (UE4) – constituída pela exploração VP18D.

Assim, para cada uma das UE, é apresentada a seguinte estrutura de resultados:

- 1) Descrição das informações obtidas por observação directa pelo autor durante as visitas às explorações alvo e pela execução dos IE;
- 2) Apresentação dos dados relativos à progressão dos resultados serológicos;
- 3) Resultados das provas de pesquisa bacteriana e sua tipificação como espécie de *Brucella spp* e, quando efectuada, também enquanto biovar.

A título introdutório, são apresentadas, na tabela 7, as principais características encontradas nas explorações analisadas.

Tabela 7 – Resumo das principais características produtivas e de biossegurança das explorações alvo.

MOE	Fêmeas presentes à data da vacinação (*)		Raças	Regime de produção	Condições de Biossegurança			Entrada de animais nos últimos 3 anos (nº de animais - data)
	Jovens	Adultas			Vedações (malha de aço)	Explorações contíguas	Espécies silvestres (abutres, raposas, texugos e furões)	
VJ31B	15	285	♀ Alentejana ♂ Charolesa	Extensivo	Completa	Não	Sim	-
VK41A	75	326	♀ Alentejana ♂ Charolesa ♂ Limousine	Extensivo	Completa	Sim	Sim	-
VU58F	22	158	Alentejana	Extensivo	Incompleta	Sim	Sim	1 ♂ - 2006 4 ♀ - 14/01/2008 13 ♀ - 16/04/2008
VU71A	28	365	♀ Alentejana ♂ Charolesa ♂ Limousine	Extensivo	Incompleta	Sim	Sim	-
VJ18B	214		Alentejana	Extensivo	Completa	Sim	Sim (principalmente abutres)	48 ♀ - 05/2003 46 ♀ - 05/2004
VJ21A	40	273	♀ Alentejana ♂ Charolesa	Extensivo	Completa	Sim	Sim (principalmente abutres)	53 ♀ - 11/2007
VP18D	196		Holstein-Frisia	Semi-intensivo	Completa + fio eléctrico	Sim	Sim (em menor escala)	-

Legenda:

(*) Foram consideradas jovens as fêmeas entre os 4 e 12 meses de idade e adultas as fêmeas com mais de um ano de idade.

♀ - Fêmeas;

♂ - Macho(s).

4.1 UE1 (explorações VJ31B, VK41A, VU58F e VU71A)

4.1.1 Características comuns às explorações da UE1

O agrupamento das 4 unidades de produção numa única UE deveu-se fundamentalmente aos seguintes factores:

- *Proximidade geográfica* – apesar de pertencerem a 3 concelhos diferentes (VK – Arronches, VU – Elvas e VJ – Monforte), pela georreferenciação das 4 explorações confirmou-se a proximidade geográfica entre elas (Figura 10). Factores como a partilha numa grande extensão de uma vedação simples (VK41A e VU71A), a partilha de um ponto de abeberamento para o gado onde os animais se encontram apenas separados por uma vedação simples (VU71A e VU58F) ou a partilha de acessos (VJ31B e VK41A), contribuem para que possa ocorrer um eventual contacto entre os animais destas explorações, ou destes com os produtos infectantes, com a consequente disseminação da doença;

- *Medidas de biossegurança semelhantes* – todas as explorações apresentam vedações simples em malha de aço em todo o perímetro, com “porteiras” sem sistemas anti-intrusão. A única exceção a este padrão encontra-se nas explorações VU71A e VU58F, na zona de margem da barragem do Caia, onde não existe vedação, funcionando a barragem simultaneamente como ponto de abeberamento e barreira natural à saída dos animais;
- *Aptidão* – todas estas explorações têm bovinos de carne, sendo a VK41A uma unidade mista que produz igualmente ovinos de carne;
- *Regime produtivo* – todas as explorações laboram em regime extensivo e são bastante limitadas em termos de infra-estruturas, que se resumem a celeiros para armazenamento de alimentos e adicionalmente, nas explorações VK41A e VJ31B, à existência de parques parcialmente cobertos destinados ao acabamento de novilhos antes do abate;
- *Maneio reprodutivo* – em nenhuma das explorações se pratica IA ou transferência de embriões, estando os touros em permanência com as fêmeas na pastagem. Os partos ocorrem também na pastagem, não havendo separação das fêmeas antes do parto. As fêmeas só são separadas do restante efectivo no período do pós-parto para reforço alimentar em períodos de escassez;
- *Maneio alimentar* – em nenhuma das explorações ocorreram alterações de maneio nos últimos anos, permanecendo os animais nas pastagens durante todo o ano, sendo efectuados reforços alimentares com palhas ou fenos e alimentos compostos, nos períodos de maior carência alimentar;
- *Raças bovinas predominantes* – em todas as explorações predominam as fêmeas de raça *Alentejana* ou cruzadas desta raça e os machos das raças *Limousine* e/ou *Charolesa*;
- *Presença abundante de fauna silvestre* – a presença de aves necrófagas (abutres), raposas, texugos e furões foi referida pelos produtores e também observada pelo autor durante as visitas às explorações;
- *Ausência de sintomatologia característica de BB* – devido ao regime produtivo praticado em todas as explorações (extensivo) a detecção e notificação de abortos é praticamente inexistente, o que não invalida a sua ocorrência pontual. No entanto, não foi verificada nem reportada a ocorrência de nenhum surto de abortos em nenhuma das explorações.

4.1.2 Características específicas de cada uma das explorações da UE1

4.1.2.1 Herdades de Gaspar e Mareares (VJ31B)

A exploração bovina de vocação carne VJ31B, constituída pelas Herdades contíguas de Gaspar e Mareares, apresenta-se como um foco de brucelose bovina desde 2005. Esta unidade de produção encontra-se na vizinhança da exploração VK41A, que dista menos de 1 km desta exploração, existindo de permeio, apenas terrenos onde não se realiza nenhum tipo de exploração agropecuária.

Esta exploração possuía, durante o foco de 2005, 3 cães pastores que foram abatidos e que não foram posteriormente substituídos.

De referir que, apesar de existirem comedouros espalhados por diversos parques, o abeberamento é garantido exclusivamente por pequenas barragens e “charcas” que existem em cada um dos parques de pastoreio.

Importa salientar que o mesmo detentor possui uma outra exploração bovina, no concelho de Campo Maior, a qual nunca apresentou animais seropositivos em nenhum dos saneamentos efectuados e é constituída, segundo o próprio, por uma “vacada” completamente distinta, sem que, também segundo o detentor, tenham sido movimentados animais entre as unidades de produção.

4.1.2.2 Herdade do Baldio (VK41A)

A Herdade do Baldio, com uma área total de cerca de 1400 hectares, é uma exploração mista, constituída por uma parte dedicada à produção de bovinos e outra dedicada à produção de ovinos. Ambos os sectores em regime extensivo e de aptidão “carne”. Estes efectivos bovinos e ovinos encontram-se permanentemente separados, pois os locais de pastoreio de cada uma das espécies são distintos, existindo mesmo, para além das vedações em malha de aço, uma ribeira entre as zonas adstritas a cada um dos efectivos.

A exploração de bovinos conta com um efectivo que ronda os 350 animais adultos, composta fundamentalmente por fêmeas de raça *Alentejana* e machos das raças *Limousine* e *Charolesa*. Quanto aos ovinos, esta exploração é constituída por cerca de 2000 animais predominantemente de raça *Merino*.

Existem 3 cães pastores e abundam as espécies silvestres.

4.1.2.3 Herdade da Almeida Nova (VU58F)

A Herdade da Almeida Nova encontra-se junto à barragem do Caia e é uma unidade de produção que detinha, à data do IE, cerca de 150 vacas aleitantes da raça *Alentejana* e 5 machos de raça indeterminada estando os animais permanentemente na pastagem. Os animais só são encerrados para efeitos de saneamento ou para tratamentos.

Os comedouros e bebedouros são metálicos e, segundo o encarregado da exploração, desinfectados pelo menos duas vezes por ano.

Em relação à introdução de animais nos últimos anos há a referir: a entrada, em 2006, de um macho adquirido em Espanha que foi abatido posteriormente na sequência de seropositividade nos rastreios de BB; uma aquisição a 14 de Janeiro de 2008 (4 Fêmeas) e outra a 16 de Abril do mesmo ano (13 fêmeas), todas de animais provenientes de explorações oficialmente indemnes de BB (B4). Esta foi a única exploração da UE1 onde se verificou a entrada de animais provenientes de outras explorações nos 3 anos anteriores à execução de IE.

Foi ainda referido pelo responsável que ocorreram dois abortos no dia seguinte à primovacinação, aos quais atribuiu pouca importância, uma vez que considerou terem sido consequência da contenção dos animais durante a intervenção.

Não existem referências à ocorrência de outros abortos e os produtos do parto, quando detectados, são enterrados.

4.1.2.4 Herdade da Casa das Vacas (VU71A)

A exploração VU71A, constituída pela Herdade da Casa das Vacas, com 970 hectares e localizada entre as explorações VK41A e VU58F, contava à data do IE com um efectivo bovino de cerca de 380 animais adultos, constituído predominantemente por fêmeas da raça *Alentejana* ou cruzadas desta raça e por machos reprodutores puros ou com presença significativa das raças *Limousine* e *Charolesa*.

Não existem cães pastores nem ocorreram alterações de manejo ou entradas de animais nos últimos anos.

4.1.3 Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE1

4.1.3.1 Na exploração VJ31B

A exploração VJ31B possui um encabeçamento bastante variável ao longo dos últimos anos, em consequência dos abates sanitários parciais de 163 animais seropositivos desde Maio de 2004.

A detecção do primeiro bovino seropositivo remonta ao rastreio periódico efectuado a 14 de Maio de 2004 (segundo rastreio no período analisado), ao qual se seguiu um período de aproximadamente 10 meses sem que tivesse sido efectuado qualquer rastreio serológico a este efectivo. No rastreio subsequente, são identificados 44 novos casos de seropositividade, num total de 284 animais e, até 26 de Março de 2008 foram abatidos 118 animais, na sequência de 14 rastreios (Tabela 8).

Tabela 8 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VJ31B.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animais seropositivos	Prevalência
04-02-2003	243	-	0,00%
14-05-2004	281	1	0,36%
09-03-2005	284	44	15,49%
10-03-2005	155	-	0,00%
19-05-2005	241	43	17,84%
27-07-2005	196	6	3,06%
05-10-2005	182	11	6,04%
05-12-2005	171	10	5,85%
03-03-2006	160	7	4,38%
02-05-2006	153	11	7,19%
04-07-2006	140	9	6,43%
11-09-2006	129	8	6,20%
14-12-2006	162	4	2,47%
05-04-2007	189	2	1,06%
16-07-2007	148	-	0,00%
23-11-2007	220	5	2,27%
26-03-2008	192	2	1,04%
01-04-2008	96	-	0,00%
06-08-2008	247	-	0,00%
Primovacinação entre 09-09-2008 e 05-12-2008 (299 animais vacinados)			
18-12-2008	246	-	0,00%
04-03-2009	274	-	0,00%
Revacinação das fêmeas jovens a 15-05-2009 (15 animais vacinados)			

De referir, a respeito dos valores anómalos apresentados na Figura 18, a existência de três saneamentos efectuados a 10 de Março de 2005, 16 de Julho de 2007 e a 1 de Abril de 2008 (Tabela 8), que apenas foram realizados a parte do efectivo existente, pelo que não deverão ser tidos em linha de conta na avaliação da progressão da situação.

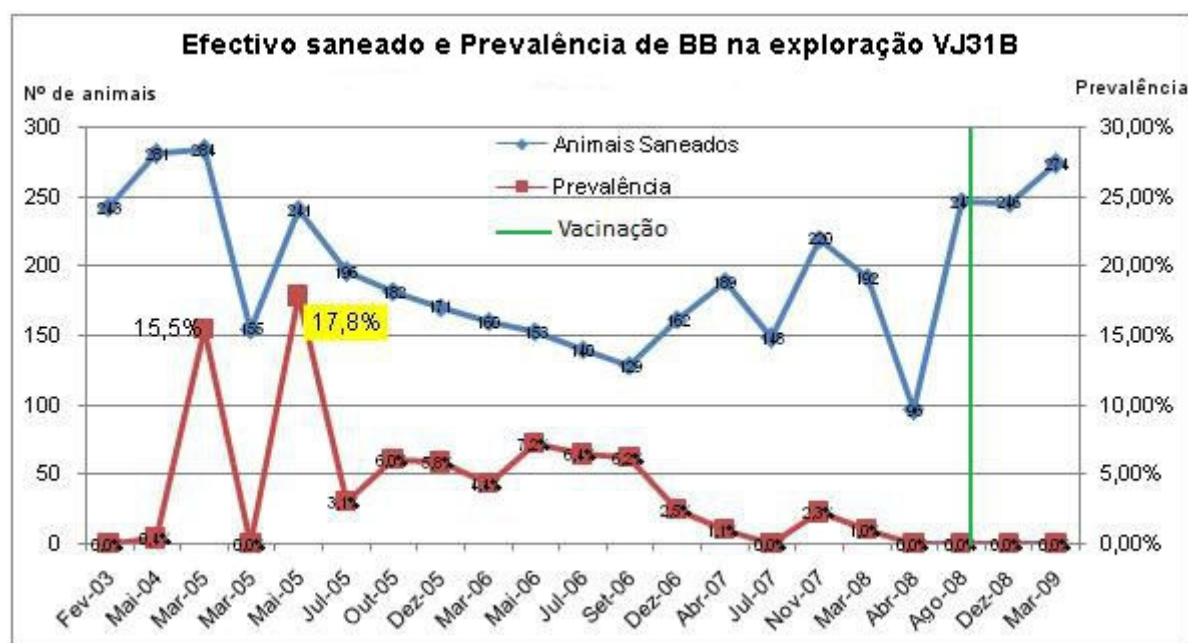


Figura 18 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VJ31B, no período compreendido entre 4 de Fevereiro de 2003 e 4 de Março de 2009.

4.1.3.2 Na exploração VK41A

A exploração VK41A é o segundo foco mais antigo de BB na região, datando os primeiros animais seropositivos de Abril de 2003. Após o rastreio de Fevereiro de 2004, esta exploração manteve-se em situação de incumprimento sanitário até final do ano de 2005. Foi realizado então um abate faseado da totalidade do efectivo bovino durante o primeiro semestre de 2006. Procedeu-se então à imposição de um vazio sanitário durante mais de 3 meses e ao consequente repovoamento com animais provenientes de explorações oficialmente indemnes de BB (B4). A 10 de Novembro de 2006, ou seja, cerca de um mês após a reintrodução dos animais surgem, 3 animais seropositivos, num rastreio efectuado apenas a 6 animais. No saneamento subsequente, efectuado em Janeiro de 2007, confirmam-se as suspeitas e surgem 6 animais seropositivos num efectivo que à data contava com cerca de 380 animais saneados.

Esta exploração, no ano e meio anterior à vacinação, apresentou valores de incidência de BB verdadeiramente preocupantes, com valores acima dos 10% (Tabela 9).

O total cumulativo de animais eliminados em abates sanitários parciais somou quase 200 animais e, no abate sanitário total decorrido no primeiro semestre de 2006, foram abatidos mais de 400 animais.

Tabela 9 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VK41A.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animas seropositivos	Prevalência
14-01-2003	355	-	0,00%
28-04-2003	394	16	4,06%
15-09-2003	379	8	2,11%
10-02-2004	417	68	16,31%
Abate sanitário total e período de vazio sanitário			
06-01-2007	379	6	1,58%
19-04-2007	372	13	3,49%
05-07-2007	406	44	10,84%
13-11-2007	423	43	10,17%
13-05-2008	382	45	11,78%
15-09-2008	326	13	3,99%
Primovacinação entre 18-09-2008 e 01-10-2008 (401 animais vacinados)			
19-12-2008	334	7	2,10%
25-03-2009	324	2	0,62%

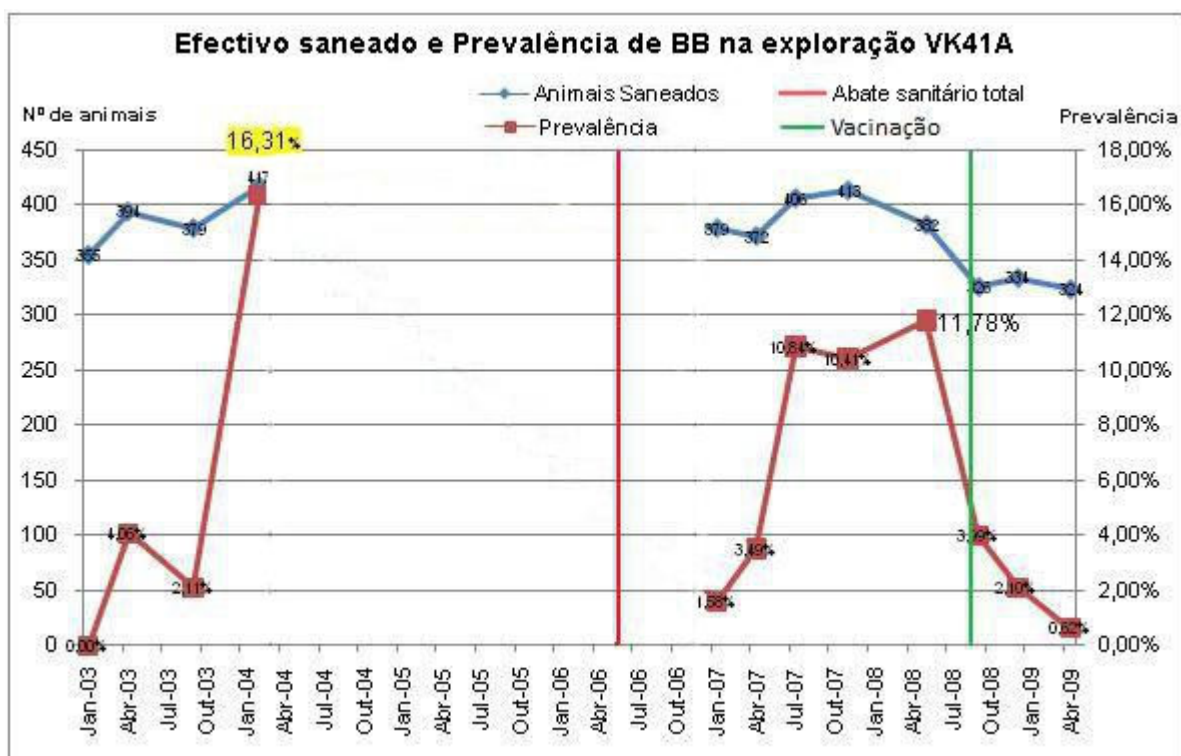


Figura 19 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VK41A, no período compreendido entre 14 de Janeiro de 2003 e 23 de Março de 2009.

4.1.3.3 Na exploração VU58F

A exploração VU58F é, das explorações que compõem a UE1, o foco mais recente de BB, datando os primeiros animais seropositivos de Maio de 2008.

O efectivo reprodutor desta exploração manteve-se praticamente constante ao longo dos últimos anos, em cerca de 150 bovinos adultos. Os 202 animais saneados em Outubro de

2008, contrariamente aos restantes saneamentos onde apenas constam os animais com idade igual ou superior a 1 ano, dizem respeito, não só aos animais adultos, mas também às fêmeas com idade superior a 4 meses que foram rastreadas e vacinadas. De referir a este respeito que, para o rastreio de Outubro de 2008, o nível de prevalência encontrado no gráfico da Figura 20 poderá apresentar um valor falacioso. Isto se considerarmos que, excluindo as fêmeas jovens rastreadas nesta data e que até à primeira gestação, ainda que infectadas, são normalmente seronegativas, o nível de prevalência teria aumentado se calculado apenas em função do efectivo reprodutor adulto. Esta situação de estabilização aparente encontrada no referido gráfico corresponde na realidade a um aumento da seroprevalência.

Tabela 10 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VU58F.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animais seropositivos	Prevalência
19-05-2003	147	-	0,00%
03-05-2004	140	-	0,00%
03-05-2005	148	-	0,00%
02-05-2006	158	-	0,00%
27-04-2007	152	-	0,00%
20-05-2008	160	2	1,25%
23-07-2008	151	3	1,99%
Primovacinação a 05-09-2008 (180 animais vacinados)			
17-10-2008	202	4	1,98%
12-12-2008	177	-	0,00%
20-02-2009	154	-	0,00%
Revacinação das fêmeas jovens a 20-05-2009 (22 animais vacinados)			

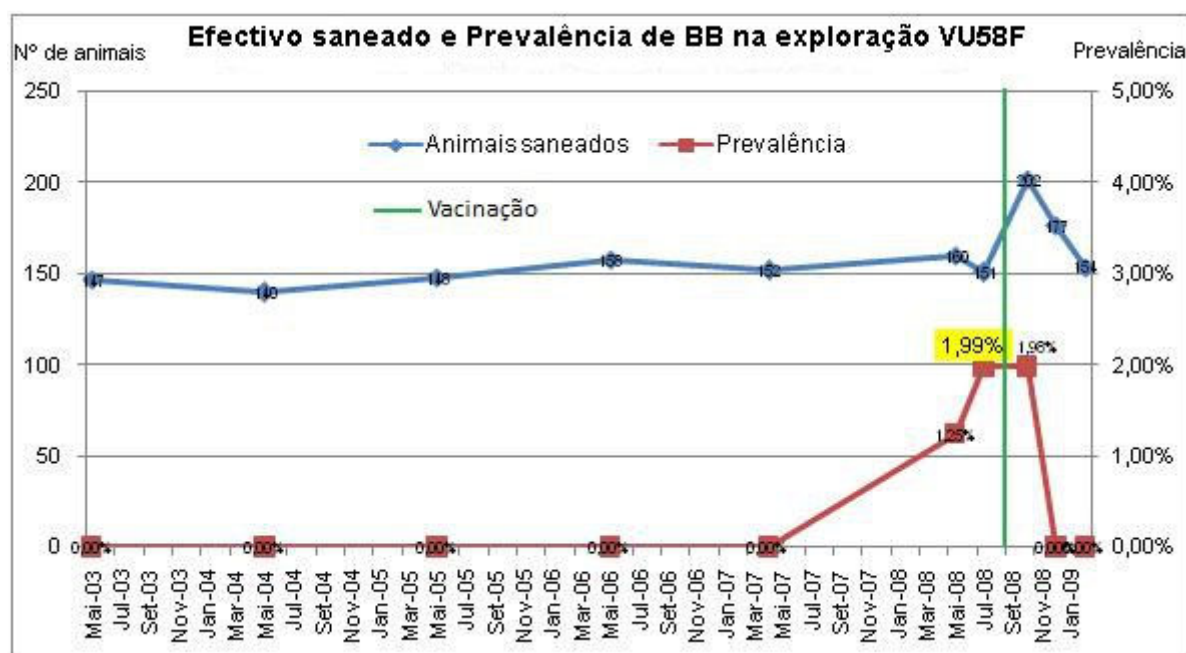


Figura 20 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VU58F no período compreendido entre 19 de Maio de 2003 e 20 de Fevereiro de 2009.

Esta exploração, em conjunto com as explorações VU71A e VP18D, é um dos focos de BB com valores de prevalência mais baixos nas UE avaliadas.

4.1.3.4 Na exploração VU71A

Este é outro “caso crónico” de BB, sendo mesmo o foco mais antigo de BB nesta região do concelho de Elvas. Apesar dos dados disponíveis no PISA.net™ não se reportarem à data, ocorreu um abate sanitário na totalidade do efectivo decorrido em Setembro de 2002, ao qual se seguiu um período de vazio sanitário que se estendeu até ao final de Janeiro de 2003, altura em que foi introduzido um novo efectivo proveniente de explorações com classificação sanitária de B4.

Desde então, esta exploração tem mantido um efectivo médio de cerca de 400 animais adultos. Os valores relativos à dimensão do efectivo encontrados nos rastreios reportados na Tabela 11, que apresentam números díspares com esta situação podem ser explicados pela realização de rastreios parciais (no caso dos valores inferiores ao efectivo médio) ou a re-inspecções de animais com primeiras amostras prejudicadas (no caso dos valores superiores ao efectivo médio), o que justifica a oscilação de valores encontrada no gráfico da Figura 21. Os valores encontrados nesta última situação são cumulativos, pois no PISA.net™ os resultados foram lançados como um evento único e no qual cada amostra é referenciada como um animal diferente.

Tabela 11 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VU71A.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animais seropositivos	Prevalência
27-04-2003	106	-	0,00%
02-07-2003	80	-	0,00%
23-03-2004	400	-	0,00%
28-11-2004	318	-	0,00%
24-05-2005	370	-	0,00%
22-05-2006	388	3	0,77%
31-07-2006	224	-	0,00%
07-10-2006	392	1	0,26%
01-03-2007	474	8	1,69%
25-05-2007	382	2	0,52%
26-07-2007	503	7	1,39%
28-09-2007	410	6	1,46%
12-12-2007	413	8	1,94%
12-03-2008	413	7	1,69%
30-05-2008	411	6	1,46%
Primovacinação entre 15-09-2008 e 23-09-2008 (393 animais vacinados)			
23-09-2008	401	8	2,00%
03-12-2008	389	1	0,26%
08-03-2009	376	-	0,00%
13-04-2009	28	-	0,00%
Revacinação das fêmeas jovens a 16-04-2009 (28 animais vacinados)			

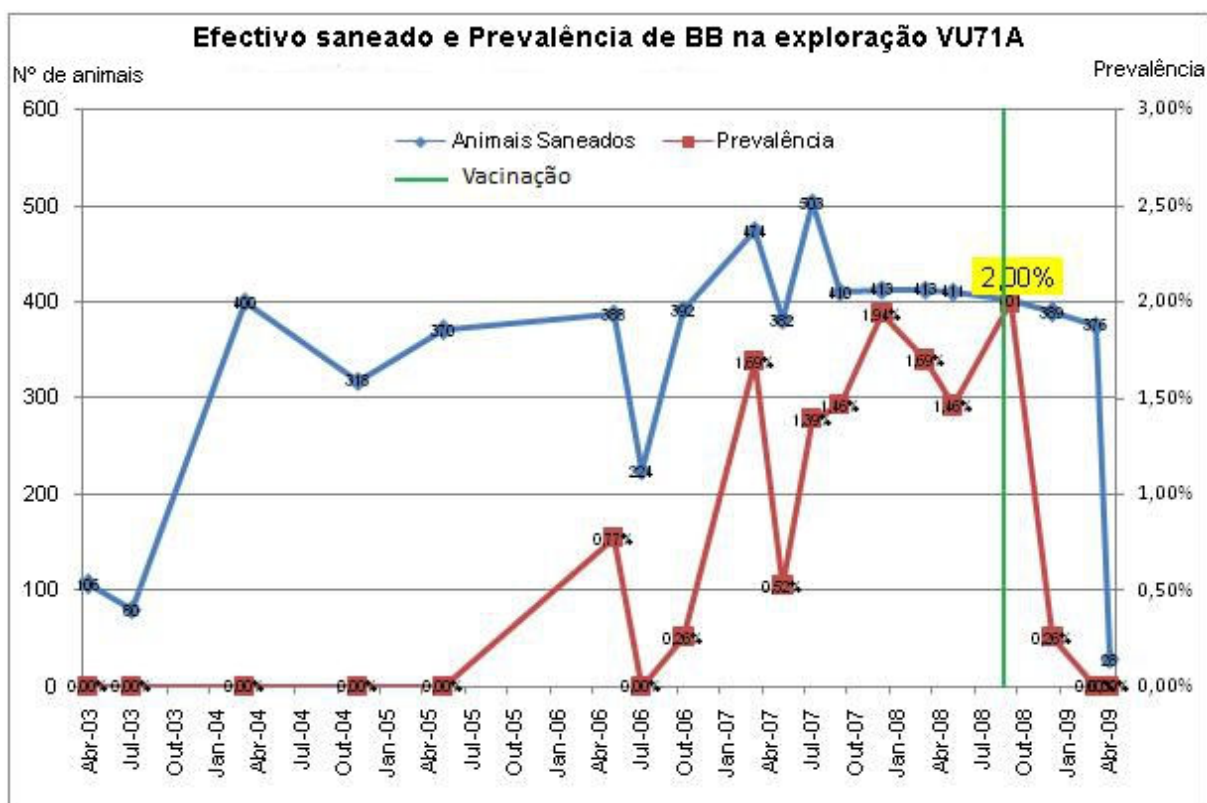


Figura 21 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VU71A no período compreendido entre 27 de Abril de 2003 e 13 de Abril de 2009.

Apesar da situação endémica de BB se arrastar desde Maio de 2006, os valores de prevalência de BB nesta exploração são, em conjunto com as explorações VU58F e VP18D, dos mais baixos encontrados nesta avaliação epidemiológica, nunca tendo atingido valores acima dos 2%.

4.1.4 Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE1

Em relação às provas de isolamento bacteriano, praticadas em amostras provenientes de animais da exploração VJ31B, abatidos na sequência de seropositividade nos rastreios serológicos periódicos, não foi possível aceder às fichas com os resultados das provas de isolamento na DIV de Elvas. Por esta razão, não foi possível obter a tipificação em termos de biovar, dos isolados encontrados (*B. abortus*). As informações apresentadas, na Tabela 12 e na Figura 22, para a referida exploração, é apenas a existente na BD da DGV (PISA.net™), na qual não se encontra armazenada informação relativa à tipificação dos isolados em termos de biovar.

Tabela 12 – Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes das explorações VJ31B, VK41A, VU58F e VU71A.

MOE	Data de			Natureza da Amostra	Descrição do animal			Resultados	
	Colheita no Matadouro	Entrada no LNIV	Emissão de Resultados		Sexo	Raça	Idade (meses)	Espécie	Biovar
VJ31B	29-11-05	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ31B	29-11-05	-	-	-	-	-	-	<i>B. abortus</i>	-
VJ31B	29-11-05	-	-	-	-	-	-	<i>B. abortus</i>	-
VJ31B	24-01-06	-	-	-	-	-	-	<i>B. abortus</i>	-
VJ31B	24-01-06	-	-	-	-	-	-	<i>B. abortus</i>	-
VJ31B	24-01-06	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ31B	03-02-06	-	-	-	-	-	-	-	-
VK41A	07-12-06	-	02-02-07	Linfonodos	-	-	-	-	-
VK41A	07-12-06	-	02-02-07	Linfonodos	-	-	-	-	-
VK41A	07-12-06	-	02-02-07	Linfonodos	-	-	-	<i>B. abortus</i>	1
VK41A	07-12-06	-	02-02-07	Linfonodos	-	-	-	-	-
VK41A	08-02-07	28-02-07	19-04-07	Vísceras	F	C	>30	<i>B. abortus</i>	1
VK41A	08-02-07	28-02-07	19-04-07	Vísceras	F	C	>30	<i>B. abortus</i>	1
VK41A	08-02-07	28-02-07	19-04-07	Vísceras	F	C	>30	-	-
VK41A	08-02-07	28-02-07	19-04-07	Vísceras	F	C	>30	<i>B. abortus</i>	1
VK41A	08-02-07	28-02-07	19-04-07	Vísceras	F	C	>30	<i>B. abortus</i>	1
VK41A	08-02-07	28-02-07	19-04-07	Vísceras	F	C	>30	<i>B. abortus</i>	1
VU58F	08-07-08	07-08-08	13-10-08	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	1
VU58F	09-07-08	08-08-08	14-10-08	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	1
VU58F	04-09-08	11-09-08	12-11-08	Linfonodos	-	-	-	<i>B. abortus</i>	3
VU58F	04-09-08	11-09-08	12-11-08	Linfonodos	-	-	-	<i>B. abortus</i>	3
VU58F	04-09-08	11-09-08	12-11-08	Linfonodos	M	-	-	-	-
VU58F	18-11-08	02-12-08	12-01-09	Linfonodos	F	A	49	-	-
VU58F	18-11-08	02-12-08	02-02-09	Linfonodos	F	A	50	<i>B. abortus</i>	1
VU58F	18-11-08	02-12-08	02-02-09	Linfonodos	F	A	38	<i>B. abortus</i>	1
VU58F	18-11-08	02-12-08	02-03-09	Linfonodos	F	A	47	<i>B. abortus</i>	-
VU71A	23-06-06	03-10-06	19-10-06	Linfonodos	F	C	>30	-	-
VU71A	23-06-06	03-10-06	19-10-06	Linfonodos	F	C	>30	-	-
VU71A	23-06-06	03-10-06	19-10-06	Linfonodos	F	C	>30	-	-
VU71A	14-11-06	23-11-06	21-12-06	Linfonodos	F	C	30	-	-
VU71A	20-03-07	22-03-07	24-05-07	Linfonodos	F	C	36	-	-
VU71A	27-03-07	03-04-07	28-05-07	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	1
VU71A	27-03-07	03-04-07	28-05-07	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	1
VU71A	27-03-07	03-04-07	28-05-07	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	1
VU71A	04-04-07	05-07-07	04-09-07	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	3
VU71A	04-04-07	05-07-07	04-09-07	Linfonodos	-	-	>30	<i>B. abortus</i>	3

Nota: No campo “Raça”, as letras A e C correspondem às raças Alentejana e Cruzada (indeterminada), respectivamente.

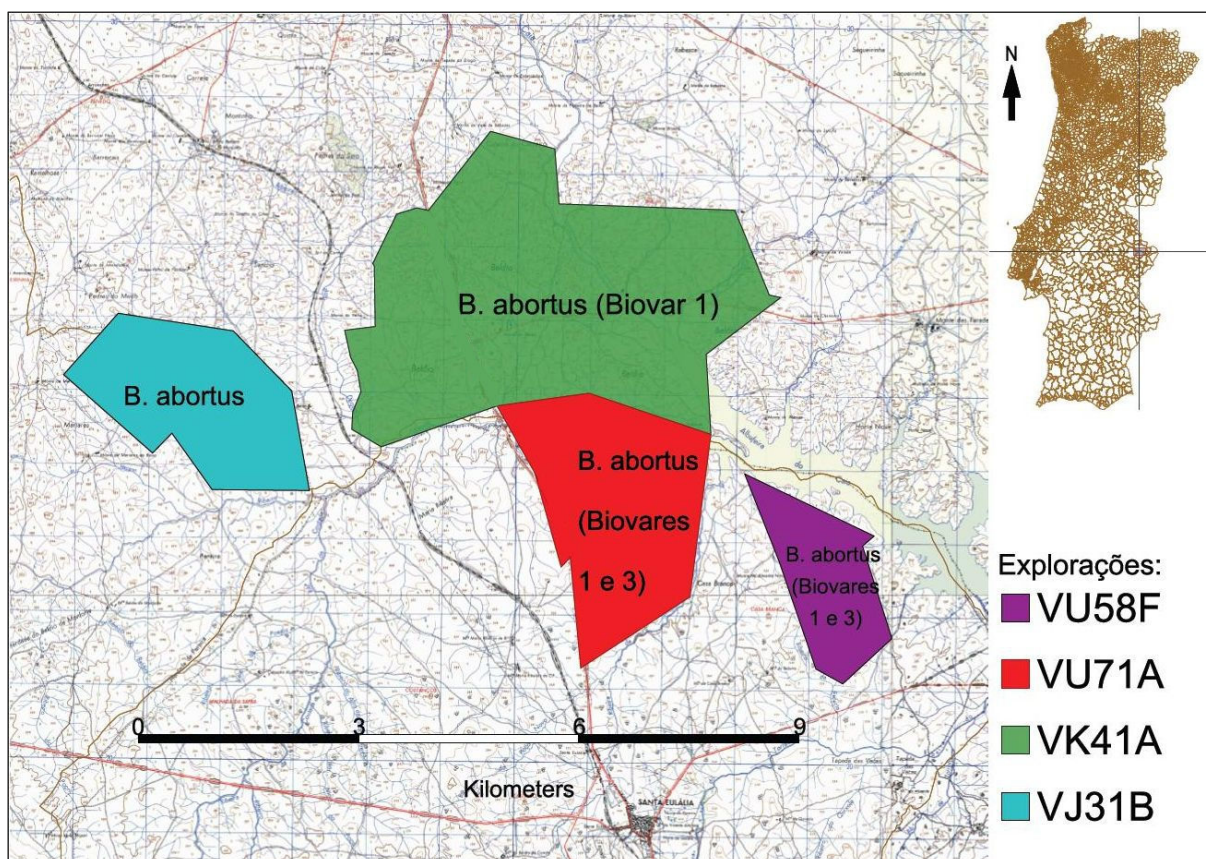


Figura 22 – Espécies e biovars de *Brucella spp* isoladas a partir de órgãos de animais provenientes das explorações indicadas (Mapa original).

4.2 UE2 (exploração VJ18B)

A exploração de marca VJ18B, com sede na Herdade da Amoreira, é uma unidade de produção de bovinos de carne em regime extensivo, com um efectivo composto predominantemente por animais de raça Alentejana com um efectivo reprodutor médio de cerca de 200 animais. Encontra-se no concelho de Monforte a uma distância considerável das explorações anteriormente descritas e, apesar de possuir na sua vizinhança duas explorações bovinas que também laboram em regime extensivo, é a única de entre estas que constitui um foco de BB. Esta situação poderá ser explicada pela existência de uma ribeira que constitui uma barreira física ao contacto entre os animais, ou destes com os produtos infectantes, provenientes desta exploração (Figura 24).

Trata-se de uma unidade de produção com a mesma tipologia das já apresentadas, ou seja, em regime extensivo tradicional, no qual os animais estão permanentemente na pastagem, sem isolamento por sexos, decorrendo os partos nas pastagens e ao longo de todo o ano, sendo as fêmeas auxiliadas no parto pelo próprio produtor, quando necessário, o que segundo o próprio apenas acontece em 1 ou 2 casos anualmente. As medidas de biossegurança encontradas são razoáveis, com vedações em malha de aço simples em todo o perímetro da exploração.

O proprietário referiu que os abortos são raros, não tendo identificado mais de dois casos no último ano. No entanto, o criador referiu que, quando surgiram os primeiros animais seropositivos, em Setembro de 2004, bem como nos meses anteriores, notou uma maior incidência de retenções placentárias que o normal na exploração, apesar de não terem ocorrido alterações de manejo.

Em termos de infra-estruturas existe um barracão para armazenamento de feno, o qual apresenta higienizações anuais antes do armazenamento dos fardos de cada campanha produtiva. Os comedouros são metálicos e o abeberamento dos animais é garantido por bebedouros automáticos, abastecidos por um poço, sendo limpos e desinfectados periodicamente.

Esta exploração não possuía cães pastores e, à semelhança das explorações já descritas, também nesta região a fauna silvestre é abundante.

4.2.1 Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE2

A exploração VJ18B apresentava um efectivo reprodutor bovino que rondava os 200 animais adultos desde Janeiro de 2005. Os valores encontrados nos rastreios de Maio de 2003 e Maio de 2004, de 48 e 46 animais, respectivamente, reportam-se a animais adquiridos e aos quais foram efectuados testes de pós-movimentação com resultados serológicos negativos (Tabela 13 e Figura 23).

Tabela 13 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VJ18B.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animais seropositivos	Prevalência
04-05-2003	48	-	0,00%
27-11-2003	169	-	0,00%
11-05-2004	46	-	0,00%
18-10-2004	164	1	0,61%
15-01-2005	192	3	1,56%
05-05-2005	222	19	8,56%
11-07-2005	190	-	0,00%
23-11-2005	180	3	1,67%
08-01-2006	184	-	0,00%
25-03-2006	188	1	0,53%
12-06-2006	192	1	0,52%
05-09-2006	170	-	0,00%
04-12-2006	166	1	0,60%
12-02-2007	176	4	2,27%
11-06-2007	216	5	2,31%
28-09-2007	183	5	2,73%
10-12-2007	205	5	2,44%
01-03-2008	198	3	1,52%
11-06-2008	212	2	0,94%
03-09-2008	223	-	0,00%
Primovacinação a 03-09-2008 (214 animais vacinados)			
30-11-2008	207	-	0,00%
28-02-2009	192	-	0,00%

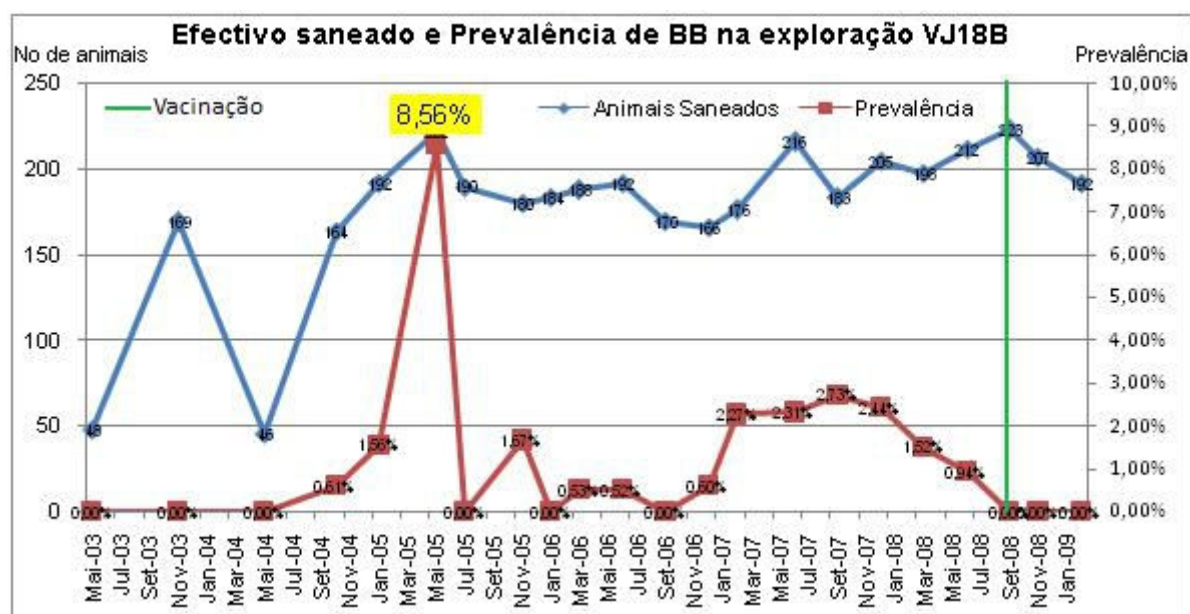


Figura 23 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VJ18B no período compreendido entre 4 de Maio de 2003 e 28 de Fevereiro de 2009.

Após o saneamento de 5 de Maio de 2005 no qual foram identificados 19 animais seropositivos, a prevalência de BB nesta exploração apresentou valores relativamente reduzidos até meados de 2008, sem no entanto ter recuperado o estatuto sanitário, pois nunca se verificaram 2 saneamentos consecutivos (num mínimo de 4) sem a ocorrência de novos animais seropositivos.

Apesar dos dados pós-vacinais serem ainda relativos a um período muito curto, a situação encontrada para a segunda metade do ano de 2008 e início de 2009 aponta para uma tendência de controlo da infecção nesta exploração.

4.2.2 Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE2

Pela mesma razão apresentada anteriormente para os isolamentos bacterianos relativos à exploração VJ31B da UE1 (secção 4.1.4, pág. 59), também para a exploração VJ18B não foi possível aceder à tipificação do biovar de *B. abortus*.

Tabela 14 - Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes da exploração VJ18B.

MOE	Data de			Natureza da Amostra	Descrição do animal				Resultados	
	Colheita no Matadouro	Entrada no LNIV	Emissão de Resultados		N.º Marca Auricular	Sexo	Raça	Idade (meses)	Espécie	Biovar
VJ18B	23-11-05	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. abortus</i>	-
VJ18B	23-11-05	-	-	-	-	-	-	-	<i>B. abortus</i>	-
VJ18B	23-11-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-

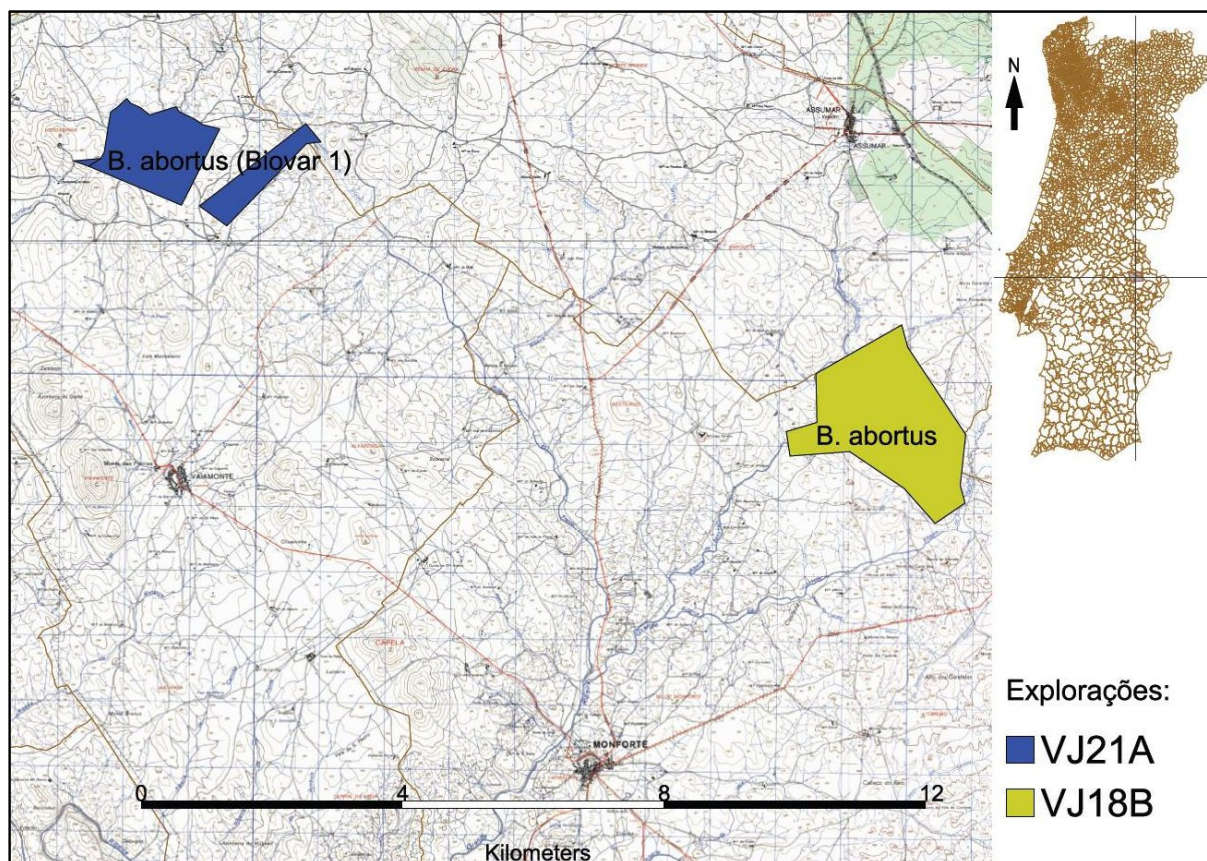


Figura 24 – Espécies e biovars de *Brucella spp* isoladas a partir de órgãos de animais provenientes das explorações indicadas (Mapa original).

4.3 UE3 (exploração VJ21A)

A exploração VJ21A, composta pelas Herdades de Muacho e Gamito e pela Herdade de Cantos (sob a mesma MOE) é, à semelhança da maioria das explorações bovinas da região de Monforte, uma unidade que labora num regime extensivo, com animais de aptidão produtiva “carne”, permanentemente na pastagem, constituída maioritariamente por fêmeas de raça *Alentejana* e machos de raça *Charolesa*.

O manejo reprodutivo deste efectivo é bastante simples não se recorrendo a inseminação artificial, a transferências de embriões ou a partilhas de reprodutores com outros efectivos, decorrendo os partos ao longo do ano, uma vez que não há separação dos machos e das fêmeas durante nenhum período do ciclo reprodutivo. Os partos decorrem também na pastagem, sendo o próprio vaqueiro a auxiliá-los sempre que necessário (poucas vezes segundo o detentor), procedendo-se ao enterramento dos produtos do parto sempre que detectados.

Quanto a sinais clínicos de BB, ocorridos no último ano antes do início da vacinação, apenas foram detectados, pelo produtor, 1 aborto tardio e 2 ou 3 casos de retenção placentária.

No que respeita a infra-estruturas para manejo do gado, estas resumem-se a uma manga, não existindo nenhum estábulo ou pavilhão.

De referir que esta exploração é contígua a outra exploração com foco de brucelose bovina, na qual ainda não foi possível comprovar a infecção do efectivo (sem isolamento de *Brucella spp*) e a uma engorda de novilhos para abate.

Um outro elemento sanitário significativo relativo a esta exploração reside no facto de estar também infectada com tuberculose bovina.

Apesar de ter sido referido pelo produtor que também nesta região existe abundante fauna silvestre, este atribuiu uma maior importância, em termos quantitativos, às aves necrófagas (abutres) que relatou como sendo uma “verdadeira praga”.

4.3.1 Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE3

O efectivo bovino adulto manteve-se praticamente constante (cerca de 390 animais) nesta exploração até à data do primeiro saneamento onde foram detectados animais seropositivos (2 animais, em Dezembro de 2005) tendo, a partir de então, sido introduzidos 3 machos e cerca de 50 fêmeas de substituição no final do ano de 2007 (provenientes de uma exploração oficialmente indemne de BB – B4), contrariamente ao que acontecia anteriormente, onde se recorria exclusivamente à auto-reposição do efectivo reprodutor (Tabela 15 e Figura 25). Esta situação foi autorizada pela Autoridade Veterinária Regional, com o comprometimento por parte do produtor de manter os animais adquiridos num local isolado do restante efectivo (ver mapa da Figura 24).

Tabela 15 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VJ21A.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animais seropositivos	Prevalência
26-05-2003	393	-	0,00%
21-05-2004	391	-	0,00%
12-12-2005	364	2	0,55%
20-05-2006	344	-	0,00%
01-08-2006	343	-	0,00%
13-11-2007	378	13	3,44%
05-04-2008	251	15	5,98%
12-06-2008	270	7	2,59%
06-09-2008	279	7	2,51%
Primovacinação entre 06-09-2008 e 18-11-2008 (313 animais vacinados)			
15-11-2008	258	4	1,54%

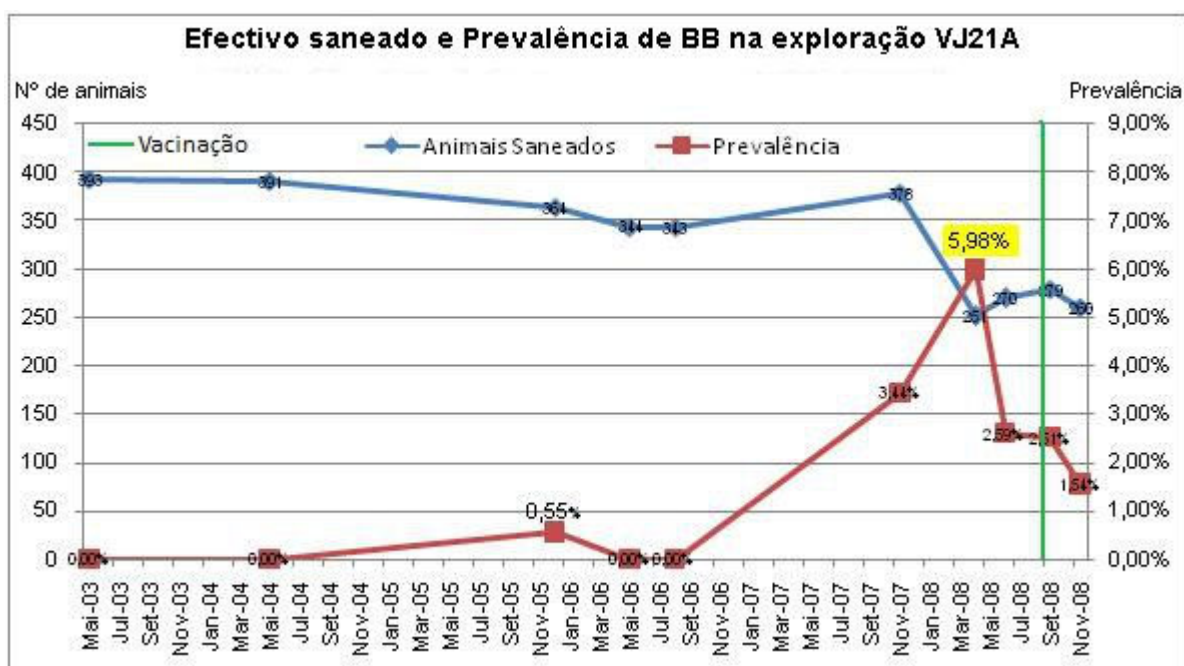


Figura 25 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VJ21A no período compreendido entre 26 de Maio de 2003 e 15 de Novembro de 2008.

4.3.2 Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE3

Nas provas de isolamento bacteriano realizadas a partir de órgãos provenientes de animais desta exploração, abatidos na sequência de seropositividade nos rastreios de BB, apenas foi isolado *B. abortus* biovar 1 (Figura 24 e Tabela 16).

Tabela 16 - Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes da exploração VJ21A.

MOE	Data de			Natureza da Amostra	Descrição do animal			Resultados	
	Colheita no Matadouro	Entrada no LNIV	Emissão de Resultados		Sexo	Raça	Idade (meses)	Espécie	Biovar
VJ21A	17-01-08	08-02-08	11-03-08	Linfonodos	-	A	-	-	-
VJ21A	17-01-08	08-02-08	11-03-08	Linfonodos	-	A	-	<i>B. abortus</i>	1
VJ21A	28-02-08	07-04-08	30-04-08	Linfonodos	-	A	-	<i>B. abortus</i>	1
VJ21A	12-06-08	07-08-08	13-10-08	Linfonodos	F	A	-	-	-
VJ21A	12-06-08	07-08-08	13-10-08	Linfonodos	F	A	-	<i>B. abortus</i>	1
VJ21A	11-12-08	23-12-08	02-03-09	Linfonodos	F	A	-	<i>B. abortus</i>	1
VJ21A	11-12-08	23-12-08	02-03-09	Linfonodos	F	A	-	-	-
VJ21A	11-12-08	23-12-08	02-03-09	Linfonodos	F	A	-	-	-
VJ21A	11-12-08	23-12-08	02-03-09	Linfonodos	F	A	-	-	-

Nota: No campo “Raça” a letra A corresponde à raça Alentejana.

4.4 UE4 (exploração VP18D)

A exploração VP18D, constituída pela Herdade da Saianda é uma exploração inserida num local onde predominam as explorações extensivas de ovinos de “carne”, tendo sido ela própria até Abril de 2009, uma unidade de produção mista, constituída por bovinos leiteiros e ovinos de carne. Actualmente é apenas uma exploração de bovinos leiteiros com aproximadamente 220 fêmeas de raça Holstein-Frisia, das quais cerca de 70 são novilhas de substituição.

O acima referido efectivo ovino constituído, no início de 2008, por aproximadamente 520 animais, foi entretanto alvo de um abate sanitário na totalidade em Abril de 2009. Este efectivo, composto por fêmeas de raça *Merino Branco* e machos puros ou cruzados da raça *Île-de-France*, apresentou no saneamento regular anual efectuado em Maio de 2008 os primeiros animais seropositivos a brucelose e, desde então, como consequência dos saneamentos extraordinários (mensais) decorrentes da perda de estatuto sanitário de B4, foram abatidos cerca de 200 animais, com resultados positivos ao rastreio serológico da referida doença. Devido à coabitação com os bovinos leiteiros, de elevado valor genético, foi proposto pelo detentor à autoridade competente (DGV) ainda durante o ano de 2008, o abate total do efectivo ovino, o qual foi aprovado e decorreu no referido mês de Abril de 2009.

Em termos de infra-estruturas, a exploração bovina é constituída por: um único pavilhão para as vacas em lactação, uma sala de ordenha contígua e a respectiva sala de recolha de leite e um outro pavilhão de menores dimensões, onde são introduzidas as fêmeas em final de gestação para que se possa proceder à suplementação alimentar e à monitorização dos partos. Desde que surgiram os primeiros animais seropositivos nos rastreios de BB, esta última instalação serve também para que se possam recolher as placentas resultantes dos partos e posteriormente destruí-las.

Todas estas infra-estruturas são, segundo o produtor, limpas e desinfectadas com elevada frequência. Os restantes bovinos, ou seja, as “vacas secas”, vitelas e novilhas de substituição encontram-se permanentemente na pastagem.

O detentor refere a ocorrência de abortos como sendo relativamente rara, tendo detectado apenas 3, entre o quinto e o sexto meses de gestação, durante o ano de 2008, sem que nenhum dos produtos de aborto tenha sido enviado para análise laboratorial.

O touro (único, uma vez que é realizada, por rotina, inseminação artificial com sémen congelado adquirido, sendo este touro utilizado apenas para cobrição natural das fêmeas que não ficaram gestantes após 2 ou 3 inseminações artificiais) é mantido junto a um dos grupos de vacas em lactação e, portanto, também ele estabulado.

Nesta exploração não existem cães pastores e, no que respeita a medidas de biossegurança, existe vedação em malha de aço e de fio eléctrico em todo o perímetro dos parques destinados aos bovinos.

Foi, no entanto, constatado que existe uma zona onde, segundo o detentor, apenas pastoreavam os ovinos, que não possui vedações e que é contígua a terrenos baldios onde pastoreiam diversos efectivos ovinos de pequena ou média dimensão pertencentes a explorações vizinhas das quais, pelo menos uma, se encontrava em incumprimento sanitário. Esta situação de incumprimento sanitário correspondia a um efectivo ovino de aproximadamente 100 animais, cujo detentor não praticava os rastreios serológicos obrigatórios. A questão foi resolvida pela DIV de Elvas em articulação com a OPP de Estremoz e autoridades policiais de Sousel (Guarda Nacional Republicana – GNR), ainda durante o período de estágio do autor naquela divisão, tendo sido efectuado o rastreio dos animais sob supervisão das referidas entidades. Como resultado da elevada prevalência encontrada foi efectuado o abate compulsivo de todos os animais e imposta interdição ao produtor de poder constituir novo efectivo pecuário.

De referir ainda que, para além dos inicialmente referidos efectivos ovinos de aptidão “carne”, existe um efectivo ovino leiteiro constituído por animais de raça *Lacaune* a cerca de 500 metros desta exploração.

À semelhança das explorações já descritas, também aqui a presença de fauna silvestre é significativa, embora em menor escala uma vez que a exploração se encontra nos limites da vila de Sousel, portanto numa zona menos isolada em relação às UE anteriormente descritas.

4.4.1 Evolução do efectivo bovino adulto e prevalência de BB na UE4

Tendo apresentado um aumento gradual no efectivo durante os primeiros 3 anos analisados, o efectivo da exploração VP18D manteve-se praticamente constante desde então num valor que ronda os 200 animais adultos, correspondentes a aproximadamente 130 animais em lactação.

Esta exploração constitui o mais recente foco de BB na região, datando a identificação dos primeiros bovinos seropositivos de Junho de 2008.

É, conjuntamente com a exploração VU58F, uma das explorações analisadas onde os valores de prevalência são mais baixos e o surgimento dos primeiros animais seropositivos mais recente (Figura 26 e Tabela 17).

Tabela 17 – Evolução do nº de animais saneados e prevalência de BB na exploração VP18D.

Data	Efectivo bovino (nº de animais rastreados)	Nº de animas seropositivos	Prevalência
13-03-2000	133	-	0,00%
16-05-2002	181	-	0,00%
30-05-2003	197	-	0,00%
08-06-2004	203	-	0,00%
31-05-2005	218	-	0,00%
29-05-2006	212	-	0,00%
08-05-2007	219	-	0,00%
27-06-2008	212	2	0,94%
13-08-2008	221	3	1,36%
02-10-2008	206	1	0,49%
28-11-2008	213	-	0,00%
11-02-2009	197	5	2,54%
Primovacinação a 11-02-2009 (196 animais vacinados)			

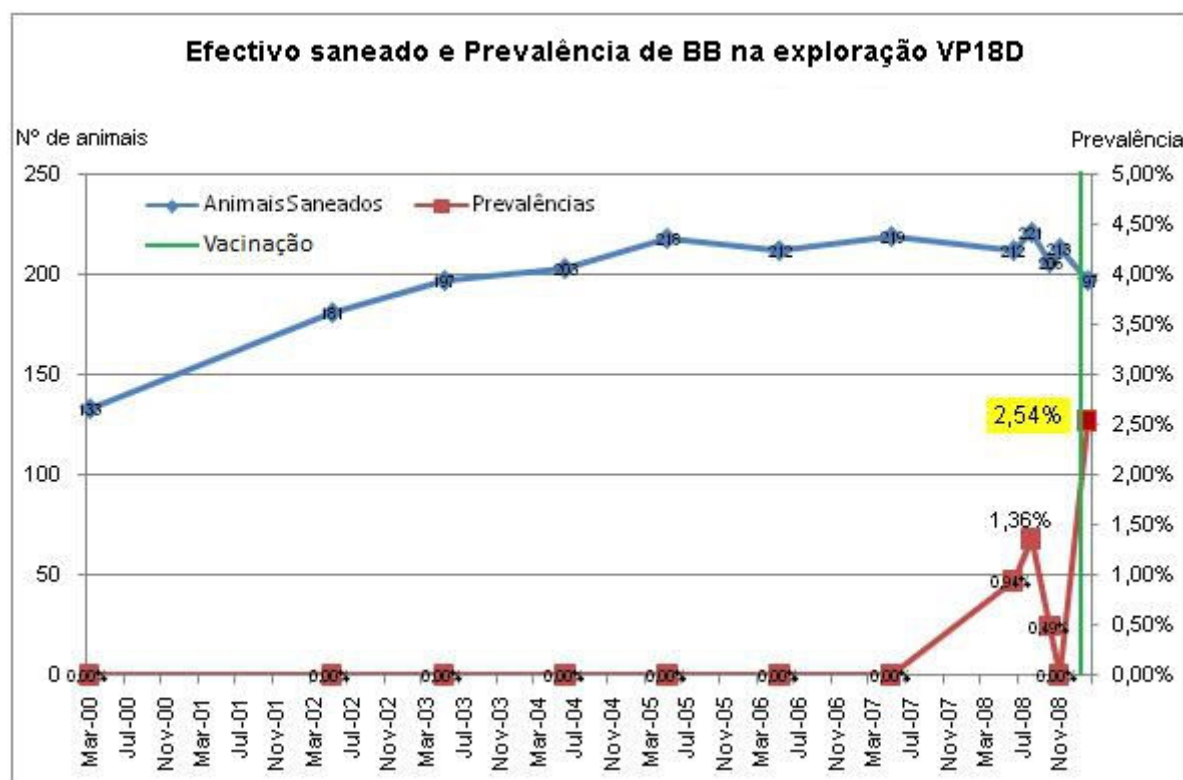


Figura 26 – Evolução do nº de bovinos saneados e das prevalências de BB na exploração VP18D no período compreendido entre 13 de Março de 2000 e 11 de Fevereiro de 2009.

4.4.2 Resultados das provas bacteriológicas (isolamentos) na UE4

A exploração VP18D é a única das explorações avaliadas onde se observou uma infecção mista por bactérias do género *Brucella spp*, datando o primeiro isolamento de *B. melitensis* (biovar 3) de Outubro de 2008 e o primeiro isolamento de *B. abortus* (biovar1) de Dezembro do mesmo ano (Tabela 18 e Figura 27).

Tabela 18 – Resultados das provas de isolamento bacteriano em animais provenientes da exploração VP18D.

MOE	Data de			Natureza da Amostra	Descrição do animal			Resultados	
	Colheita no Matadouro	Entrada no LNIV	Emissão de Resultados		Sexo	Raça	Idade (meses)	Espécie	Biovar
VP18D	15-7-08	7-8-08	8-10-08	Linfonodos	F	HF	-	<i>B. melitensis</i>	3
VP18D	15-7-08	7-8-08	8-10-08	Linfonodos	F	HF	-	<i>B. melitensis</i>	3
VP18D	4-9-08	11-9-08	12-11-08	Linfonodos	F	HF	-	<i>B. melitensis</i>	3
VP18D	4-9-08	11-9-08	12-11-08	Linfonodos	F	HF	-	<i>B. melitensis</i>	3
VP18D	4-9-08	11-9-08	12-11-08	Linfonodos	F	HF	-	-	-
VP18D	28-10-08	7-11-08	11-12-08	Linfonodos	F	HF	-	<i>B. abortus</i>	1
VP18D	12-3-09	19-3-09	27-4-09	L, F, B e M	F	HF	-	-	-
VP18D	12-3-09	19-3-09	27-4-09	L, F, B e M	F	HF	-	<i>B. melitensis</i>	3
VP18D	12-3-09	19-3-09	27-4-09	L, F, B e M	F	HF	-	<i>B. abortus</i>	1
VP18D	12-3-09	19-3-09	27-4-09	L, F, B e M	F	HF	-	<i>B. abortus</i>	1
VP18D	12-3-09	19-3-09	27-4-09	L, F, B e M	F	HF	-	-	-

Notas: Na coluna referente à natureza da amostra as iniciais têm os seguintes significados: L – linfonodos; F – fígado; B – baço; M – glândula mamária. Na coluna referente à raça, a sigla HF corresponde à raça Holstein-Frisia.

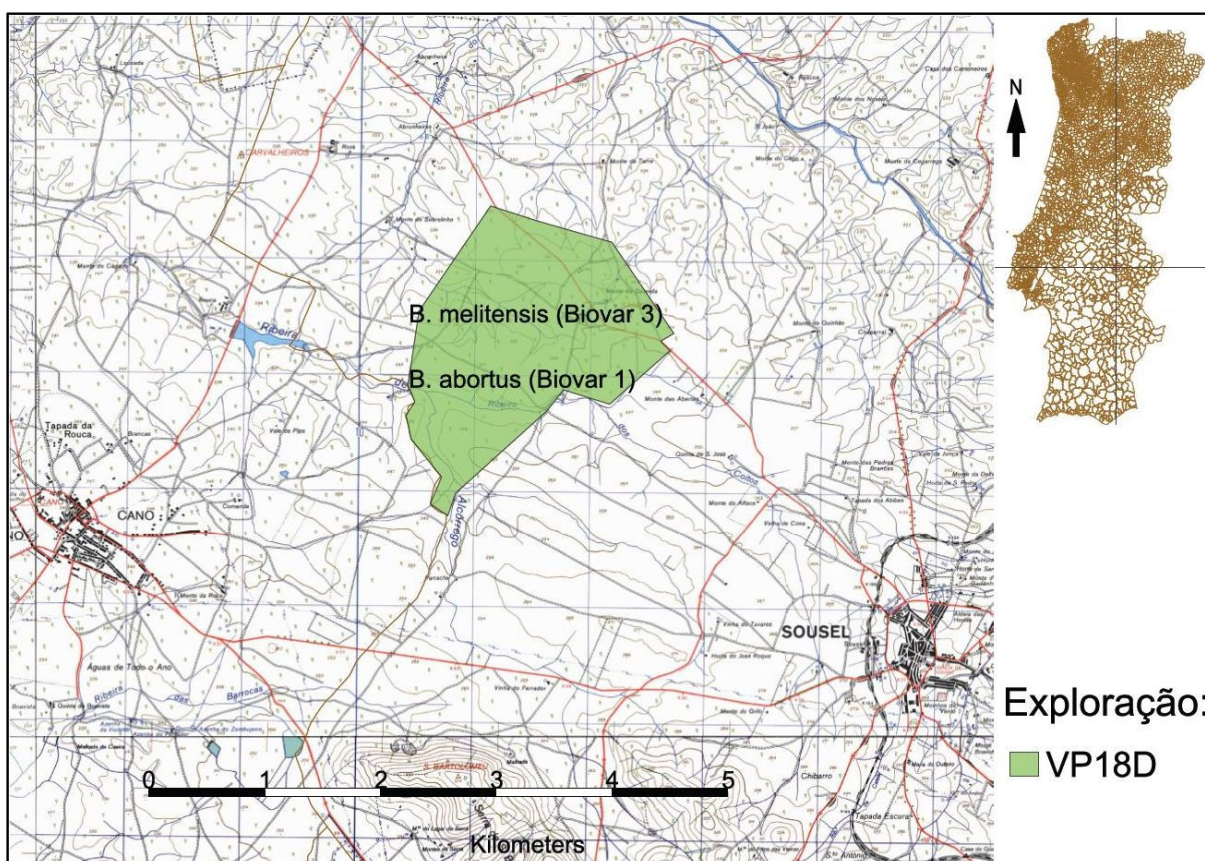


Figura 27 – Espécies e biovars de *Brucella spp* isoladas a partir de órgãos de animais provenientes da exploração indicada (Mapa original).

5. DISCUSSÃO

A prevalência de BB por freguesia tanto a nível de explorações como de animais seropositivos permitiu constatar que, na generalidade, as freguesias com maiores efectivos bovinos eram também as que apresentavam maior prevalência de BB no ano de 2008. Nas freguesias afectadas as explorações incluídas neste estudo eram as únicas com BB. Apenas na freguesia de Vaiamonte, concelho de Monforte surgiu, durante o período de estágio curricular do autor na DIV de Elvas, uma exploração seropositiva a BB, na ocasião não incluída no programa de vacinação.

No período de 1 de Janeiro a 17 de Julho de 2009, verificou-se uma redução da seroprevalência de BB em 4 das 5 freguesias analisadas relativamente a 2008, tendo esta tendência sido contrariada unicamente na freguesia de Sousel, concelho de Sousel, à qual pertencia a exploração VP18D, na qual se verificou mesmo um aumento da prevalência da doença.

Não é possível, no entanto, atribuir esta tendência de redução à implementação da vacinação com RB51 complementarmente às medidas sanitárias e de biossegurança, uma vez que na maioria das explorações ainda só tinha ocorrido a primovacinação no final do ano de 2008 e, na VP18D, essa vacinação só se iniciou em Fevereiro de 2009. É precoce retirar conclusões acerca da eficácia da vacina em termos de impacto na prevalência e incidência de BB, uma vez que os dados disponíveis se reportavam a um período pós vacinal inferior a um ano, equivalente a menos de um ciclo produtivo e a duração do programa de vacinação é, no mínimo, de 5 anos.

A decisão por parte da autoridade veterinária regional (DSVRALT) de instituir um programa de vacinação com RB51 nas explorações apresentadas, como complemento às medidas de controlo anteriormente instituídas (abate compulsivo dos animais seropositivos e controlo apertado da movimentação animal) na zona de intervenção da DIV de Elvas, prendeu-se sobretudo com os seguintes factores:

- Como foi demonstrado pela caracterização prévia da região as explorações infectadas com BB e com possibilidade de se tornarem infectantes para os efectivos vizinhos se resumiam às constantes das UE1, UE2 e UE3. A vacinação decorreu apenas nestas explorações, pois apesar de existir uma exploração seropositiva nas imediações da exploração VJ21A, à data do estabelecimento dos PIS nas 6 explorações pertencentes às UE referidas, ainda não existiam resultados das provas de pesquisa bacteriana relativas aos animais seropositivos provenientes desta exploração, o que invalidou a sua inclusão no programa de vacinação inicial, por não ser garantido o seu estatuto de exploração infectada;
- Por outro lado, pela progressão emergente da infecção nas explorações vizinhas pertencentes à UE1 e, principalmente, pela sua difusão à exploração VU58F, cna

qual surgiram os primeiros animais seropositivos em Maio de 2008, houve o receio de que a disseminação da BB na região pudesse aumentar. Esta situação justificou a procura de, por via da vacinação massiva dos efectivos femininos reprodutores presentes e das fêmeas de substituição, se tentasse minimizar a excreção do agente e, consequentemente, a contaminação ambiental;

- A inclusão da exploração VP18D (UE4) no programa de vacinação surgiu com o intuito principal de procurar controlar a progressão da infecção na exploração (biocontenção), uma vez que não existiam explorações de bovinos nas imediações, nem existiam explorações infectadas nos últimos 10 anos, apesar de a presença de brucelose dos pequenos ruminantes ser uma realidade antiga;
- Para a tomada de decisão da vacinação nas 7 explorações pesou ainda o facto de em todas elas se ter verificado um comprometimento por parte dos produtores na procura de solução para o problema. Situação economicamente justificada, pois apesar do cumprimento escrupuloso dos rastreios obrigatórios, com o consequente abate compulsivo dos animais seropositivos e do controlo apertado da movimentação animal nas explorações afectadas, verificados nos anos anteriores à vacinação, a erradicação da doença nestes efectivos parecia apresentar um progresso algo limitado.

No que respeita à avaliação dos factores de risco associados à disseminação e transmissão da BB encontrados nas explorações analisadas foi muitas vezes impossível a identificação da origem da infecção pela realização dos IE devido, fundamentalmente, à diversidade de factores de risco com importância na transmissão da doença presentes em simultâneo. No entanto, foram identificados vários factores de risco a seguir descritos, que mereceram uma reflexão aprofundada e que podem ser objecto de uma intervenção no sentido de limitar a contaminação ambiental por *Brucella spp.*

Uma situação comum às explorações que laboram em regime extensivo prende-se com a ausência de infra-estruturas para o isolamento dos animais no período periparto com o objectivo de diminuir a contaminação ambiental por *Brucella spp.* Apesar das acções de sensibilização por parte dos serviços veterinários regionais junto dos produtores para a necessidade de se fazer o controlo dos partos nas explorações infectadas, foi constatado que, na generalidade das explorações em regime extensivo, este controlo não é praticado. Esta situação ocorre fundamentalmente por não serem efectuados, por rotina, diagnósticos de gestação nestas explorações e não serem mantidos registos da data provável de parto, sendo portanto impraticável a separação dos animais no período do pré-parto.

Também no que diz respeito às condições de biossegurança das explorações analisadas, importa referir que sendo as vedações de malha de aço (simples) a única barreira entre efectivos de explorações contíguas, estas não são eficazes para impedir o contacto entre os animais das explorações e os produtos infectantes (abortos e placentas) de explorações

contíguas. A esta realidade acresce a ineficiência destas vedações no controlo da movimentação das espécies silvestres (sobretudo das carnívoras ou necrófagas, abundantes nas explorações analisadas) entre explorações, permitindo uma eventual ampliação da contaminação ambiental por transporte dos produtos do parto ou abortos infectados por *Brucella spp.*

Outro factor importante em termos de biossegurança prende-se com a inexistência de controlo no acesso às explorações. As “porteiras” não são barreiras à passagem de pessoas ou veículos, não tendo nenhum método de segurança associado. A esta situação acresce o facto de não existir nenhum método de limpeza e desinfecção (rodilúvio, por exemplo) nos locais de acesso de veículos. Os comerciantes de gado podem apresentar um factor de risco acrescido, por circularem frequentemente entre explorações deste tipo.

Um dos factores de risco frequentemente apontado como relevante na transmissão e disseminação da BB prende-se com a dimensão do efectivo, sendo associado, por norma, um maior risco de disseminação da doença a um efectivo de maiores dimensões ou com maior densidade animal (Crawford, Huber, & Adams, 1990). No entanto, nesta avaliação epidemiológica não foi possível fazer este tipo de inferência, uma vez que esta relação não é linear, ou seja, nem sempre as explorações com maiores efectivos bovinos foram aquelas onde se verificaram valores de prevalência mais elevados.

Efectivamente, comparando por exemplo as explorações VK41A e VU71A, ambas pertencentes à UE1, podemos verificar que apesar de ambas apresentarem um efectivo bovino saneado que ronda as 400 cabeças, para a primeira os valores máximos de prevalência encontrados chegam a ultrapassar em mais de 5 vezes os da segunda. As explorações VJ31B (pertencente à UE1) e VJ18B (UE2) com efectivos bovinos saneados médios com valores próximos de 200 animais (sensivelmente metade da exploração VU71A) e todas com tipologia semelhante (regime extensivo com os animais permanentemente na pastagem) apresentaram, para o período analisado, valores de prevalência de BB bastante mais elevados apesar da dimensão do efectivo ser de sensivelmente metade.

Cronologicamente, apesar de a origem da infecção brucélica na região de acção da DIV de Elvas não estar esclarecida pela ausência de dados anteriores ao ano de 2003, ou seja, dados referentes ao período anterior à implementação do *software* PISA™, foi possível obter algumas informações durante a execução dos IE que ajudaram a clarificar a situação.

O primeiro caso de seropositividade de BB surgiu na exploração VU71A e evoluiu para o abate sanitário da totalidade do efectivo em Setembro de 2002, ao qual se seguiu um período de vazio sanitário de mais de 3 meses, tendo sido esta exploração repovoada com bovinos provenientes de explorações oficialmente indemnes (B4). O problema viria a surgir novamente nesta exploração em Abril de 2006, ou seja, mais de 3 anos após o repovoamento (Figura 28).

Os primeiros animais seropositivos na exploração vizinha VK41A surgem em Abril de 2003 (16 animais) e, sensivelmente um ano depois, na exploração VJ31B (1 animal), esta última distando escassas centenas de metros da exploração VK41A (Figura 28).

Em Maio de 2008 surgem, na exploração VU58F (vizinha da exploração VJ71A), os primeiros 2 animais seropositivos (Figura 28).

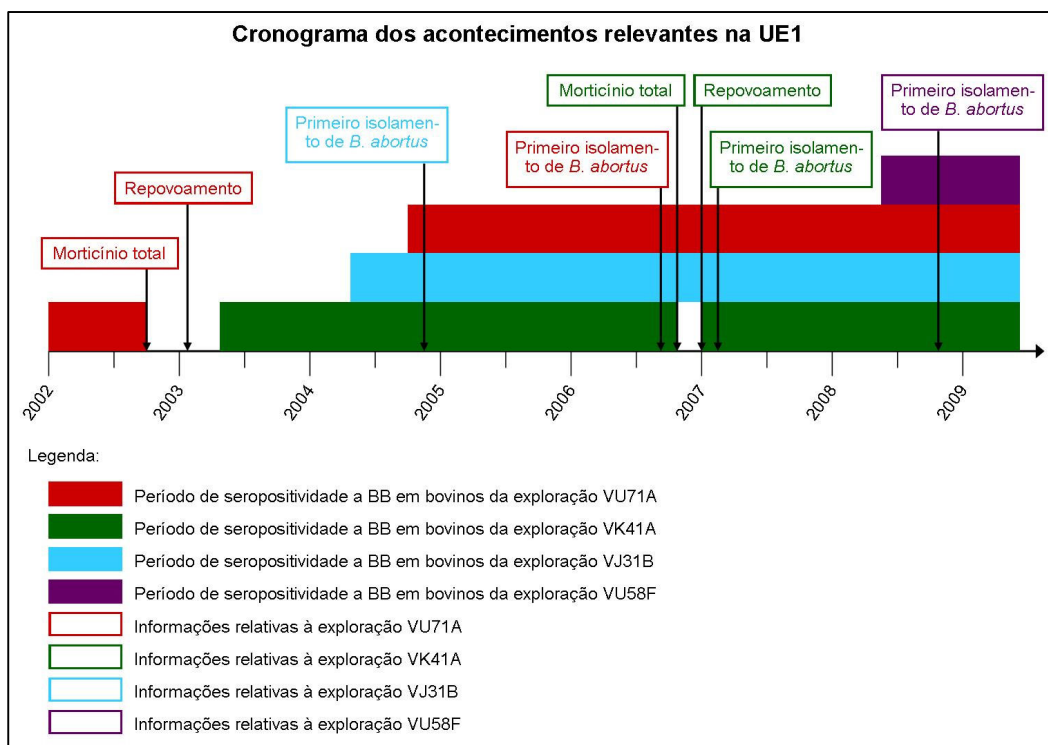


Figura 28 – Principais eventos com importância sanitária na UE1.

Em Outubro de 2004 surgem os primeiros animais seropositivos a BB na exploração VJ18B (UE2) que, curiosamente, tinha adquirido 46 novilhas de substituição em Maio de 2003 e mais 48 sensivelmente um ano depois, com o objectivo de ampliar o efectivo reprodutor nos anos subsequentes (Figura 29).

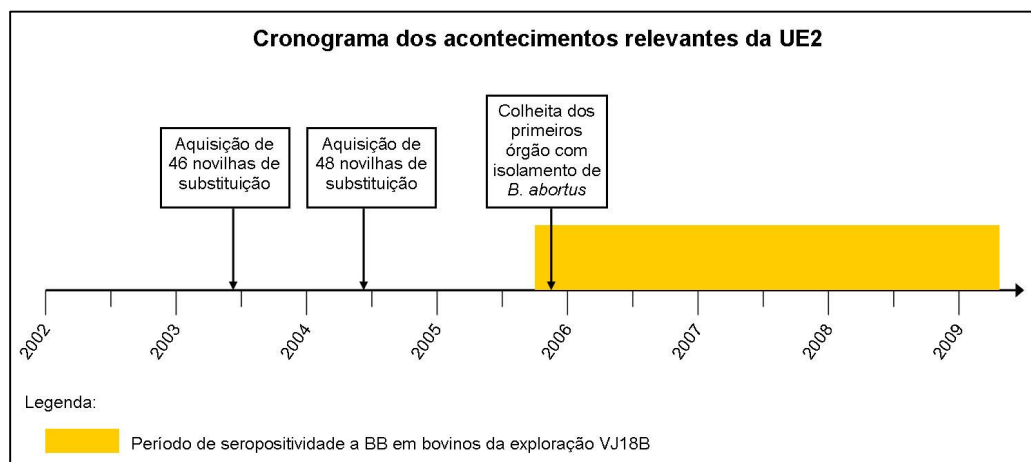


Figura 29 – Principais eventos com importância sanitária na UE2.

Na exploração VJ21A surgem, em Dezembro de 2005, os primeiros 2 bovinos seropositivos e, após os 2 saneamentos subsequentes sem mais resultados positivos e consequente recuperação do estatuto de oficialmente indomne (B4) que havia sido suspenso (B4S), apareceram, no rastreio efectuado em Novembro de 2007, 13 animais seropositivos (Figura 30).

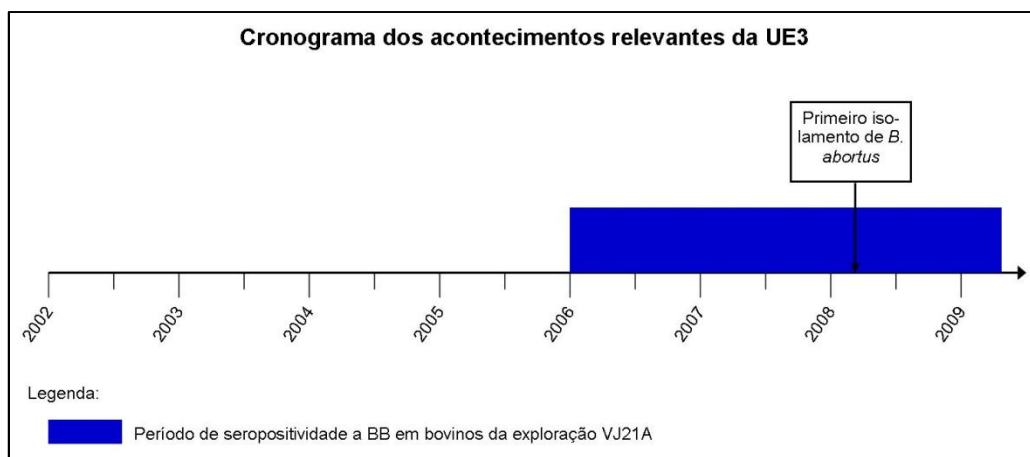


Figura 30 – Principais eventos com importância sanitária na UE3.

No mês de Junho de 2008, surgem também os primeiros casos de seropositividade nos bovinos da exploração VP18D, cerca de um mês depois do aparecimento dos primeiros ovinos reagentes nesta mesma exploração (Figura 31).

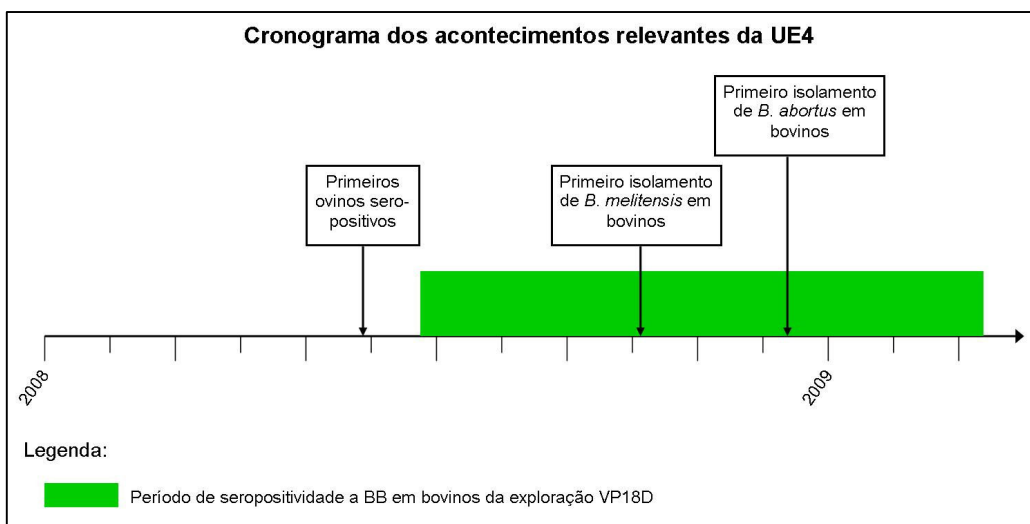


Figura 31 – Principais eventos com importância sanitária na UE4.

No que diz respeito à evolução em termos de seroprevalência de BB nos efectivos analisados foi possível constatar que, à excepção da exploração VP18D cuja prevalência aumentou no saneamento efectuado à data da vacinação e das explorações VJ31B e VJ18B que apresentaram, desde a data da vacinação até ao último rastreio, valores de prevalência nulos, em todas as outras explorações (4) foi verificada uma redução da prevalência de BB.

Analisando os resultados das provas serológicas relativos à UE1 foi possível identificar vários pontos que merecem uma análise mais cuidada. Em relação à exploração VJ31B, no rastreio efectuado em Maio de 2004 foi identificado o primeiro animal seropositivo. No entanto, verificou-se que ocorreu um período de incumprimento sanitário de quase 10 meses sem que tivessem sido realizados os saneamentos obrigatórios, que deveriam ter sido iniciados com a maior brevidade possível e repetidos a todos os 30 dias após a saída dos animais seropositivos para abate sanitário. Esta situação levou a que, no rastreio subsequente, em Março de 2005, surgissem 44 animais seropositivos (15,49% do efectivo reprodutor) e no rastreio seguinte, realizado 3 meses depois, surgissem mais 43 animais seropositivos (17,84% do efectivo reprodutor). Destes dados podemos inferir a importância da curta periodicidade dos rastreios serológicos, na detecção e consequente eliminação dos animais seropositivos, para o controlo da disseminação da infecção ao restante efectivo coabitante. O incumprimento revela ainda a elevada contagiosidade da BB, quando os animais infectados permanecem no mesmo local de animais susceptíveis, por longos períodos de tempo. Esta inferência encontra-se de acordo com os estudos de Herrera-López, *et al.* 2010, no que respeita à dificuldade na diminuição da prevalência e da incidência de BB, quando os animais infectados permanecem na exploração.

Outro ponto significativo em relação à exploração VJ31B prende-se com o facto de, no saneamento efectuado à data da vacinação, o efectivo não ter apresentado nenhum animal seropositivo. A tendência manteve-se durante os saneamentos subsequentes e, segundo a legislação nacional, este efectivo bovino apresentou uma subida de estatuto sanitário (de B2.1 para B2) ao conseguir dois saneamentos consecutivos sem animais seropositivos detectados e encontrava-se, à data da recolha dos dados a partir do *PISA.net*TM, apenas a um rastreio sem animais seropositivos para uma nova subida de estatuto para B3 (indemne).

A referida situação vem por em causa a necessidade de vacinação deste efectivo bovino, dado que, devido à data de vacinação ser tão recente, o sucesso aparente na erradicação da BB desta exploração parece ser devido exclusivamente às medidas sanitárias de controlo da doença (rastreios serológicos periódicos com consequente abate sanitário dos animais reagentes e restrições à movimentação animal de e para a exploração em causa). No entanto, como no método de vacinação massiva utilizado não são mantidos grupos de controlo, não é possível saber se a regressão da seropositividade que se verificou nos controlos serológicos subsequentes se deve exclusivamente às referidas medidas sanitárias, ou se a vacinação desempenhou um papel importante na evolução favorável da situação.

A análise mais pormenorizada da exploração VK41A permitiu também retirar algumas conclusões preliminares. Numa unidade de produção onde o controlo da movimentação animal e o rastreio serológico periódico e respectivos abates sanitários parciais pareciam

não conseguir baixar os altos níveis de prevalência de BB de 10% (mantidos nos rastreios efectuados entre Julho de 2007 e Julho de 2008), verificou-se que, no rastreio serológico efectuado em Setembro de 2008 este valor baixou para cerca dos 4%, no rastreio subsequente para um valor pouco acima dos 2% e, no último rastreio referenciado, para um valor de 0,62%, o que revela uma evolução bastante favorável da situação.

Esta exploração apresentou animais seropositivos a BB logo no primeiro saneamento efectuado depois do repovoamento com animais provenientes de explorações oficialmente indemnes (B4T3L4I) apesar de ter cumprido escrupulosamente o período de vazio sanitário imposto. Esta situação salienta a importância dos testes de pré-movimentação (que à data não eram obrigatórios) no esclarecimento da situação, uma vez que é impossível saber se os animais introduzidos já vinham infectados ou se, por outro lado, se infectaram já na exploração, no período compreendido entre a reintrodução dos animais e o primeiro saneamento completo do efectivo. Presentemente, em situações semelhantes a esta, poderia ser pertinente a introdução da biotipificação molecular das bactérias isoladas em termos de “bruces” (Le Flèche *et al.*, 2006). Este tipo de prova pode permitir não só o esclarecimento da origem da infecção (reinfecção no local ou infecção latente dos animais introduzidos, apesar da seronegatividade nos testes de pré ou pós-movimentação) mas também dos tipos de isolados nas UE.

No que respeita às outras duas explorações que compõem esta UE (VU58F e VU71A) a seroprevalência nunca atingiu valores acima dos 2%, mostrando os dados mais recentes, referentes aos dois últimos rastreios efectuados aos efectivos bovinos de cada uma delas, valores de prevalência nulos.

A respeito da seroprevalência de BB na exploração VU71A, observou-se que os dados do *PISA.net*TM relativos ao efectivo saneado apresentavam grandes oscilações em relação ao real valor do número de animais saneados (cerca de 400 animais adultos), esta situação pode ser explicada pelo lançamento dos dados no referido programa ter sido feito de forma repartida no tempo. Esta situação é recorrente no *PISA.net*TM, pois o programa não permite associar várias datas de colheita de sangue a um mesmo evento sanitário, ocorrendo situações similares em efectivos de grandes dimensões e que não podem ser saneados apenas num dia de trabalho no campo.

Quanto à UE2, constituída pela exploração VJ18B, a evolução da prevalência em termos de serologia parece apontar para que a origem da infecção se teria verificado como resultado da introdução de animais na exploração. Apesar do produtor se ter salvaguardado com a realização de testes de pós-movimentação praticados nos animais adquiridos à entrada na exploração (46 animais em Maio de 2003 e 48 animais em Maio de 2004), os primeiros animais seropositivos surgiram cerca de 5 meses depois da entrada do segundo grupo de animais adquiridos. Esta situação pode ser explicada se tivermos em linha de conta que os animais adquiridos, apesar de provenientes de explorações com estatuto sanitário B4, se

tratavam de novilhas de substituição e que, portanto, poderiam estar latentemente infectadas, ter obtido resultados de seronegatividade e ter actuado como agentes disseminadores da infecção ao primeiro parto (Nicoletti, 1980). A progressão da situação serológica ajuda também a sustentar esta hipótese, pois foi cerca de um ano depois da última introdução de animais que se verificou um aumento brutal da prevalência (para 8,56%).

Também havia sido referido pelo produtor quando se realizou o IE que, apesar de os abortos serem raros, ocorreu um aumento na incidência de retenções placentárias nos meses que antecederam o referido saneamento em que se verificou um aumento considerável da seroprevalência. Esta sintomatologia encontrada pode ser indicadora de infecção por *B. abortus* (Radostitis *et al.*, 2007).

Nos últimos 3 rastreios efectuados a este efectivo não foram detectados quaisquer animais seropositivos, o que permitiu uma subida de estatuto sanitário desta exploração para B2. Esta evolução mais recente da seroprevalência da doença deixou uma boa indicação de que o estatuto B3 poderia ser rapidamente conseguido.

Relativamente às UE3 e UE4 a origem provável da infecção não parece dever-se à introdução de animais provenientes de outras explorações, pois segundo os produtores não ocorreram novas entradas, o que foi comprovado pela inexistência de registos oficiais no SNIRA (Sistema Nacional de Informação e Registo Animal).

Em relação à UE3, apesar dos primeiros 2 bovinos seropositivos terem sido detectados no rastreio efectuado em Dezembro de 2005, existiu um período posterior de quase 2 anos, sem que ocorressem animais seropositivos, até serem detectados 13 novos casos, já em Novembro de 2007.

A respeito deste período em que não foram detectados novos casos seropositivos é conveniente fazer algumas reflexões, uma vez que esta situação acentua a importância das provas de isolamento bacteriano como complemento ao rastreio serológico dos efectivos. No caso desta exploração, as provas de isolamento bacteriano apenas foram realizadas em Janeiro de 2008 (com os resultados a serem emitidos apenas em Março do mesmo ano) e nos quais, a partir de 2 amostras provenientes dos animais abatidos na sequência dos rastreios de Novembro de 2007, se obteve um isolamento de *Brucella abortus* biovar 1, o que também veio a acontecer em 3 isolamentos posteriores.

A complementaridade das duas provas referidas anteriormente pode ser evidenciada nesta situação pois, se tivessem sido obtidos isolamentos a partir de amostras provenientes dos primeiros animais seropositivos detectados nesta exploração, a ocorrência de eventual positividade nas referidas provas, obrigaria à descida do estatuto sanitário da exploração (para B2.1) e implicaria a realização mais frequente de rastreios serológicos ao efectivo. Como houve uma recuperação do estatuto de oficialmente indemne (B4), que só obriga a um rastreio serológico anual, a detecção de novos casos de seropositividade nesta

exploração só ocorreu no rastreio anual obrigatório no qual surgiram os 13 animais seropositivos.

No que respeita ao saneamento subsequente, realizado em Abril de 2008, apesar de a prevalência ter aumentado de 3,44% para 5,98%, o que correspondeu ao surgimento de 15 novos casos de seropositividade, é preciso salientar que houve uma redução de 125 animais no efectivo reprodutor, explicada pela opção, por parte do produtor, de refugar os animais que considerava potencialmente infectados (animais que não estavam gestantes e animais que fizeram retenções placentárias ou metrites severas no período pós-parto), no período compreendido entre os dois referidos saneamentos.

Tendo em conta o que foi exposto e apesar da frequência dos rastreios subsequentes não ter sido a mais aconselhada, a prevalência de BB nesta exploração apresenta uma tendência clara de redução. Não foi possível obter informações mais recentes em relação à seroprevalência de BB nesta exploração devido ao facto de não terem sido efectuados novos rastreios em datas posteriores a Novembro de 2008, num momento em que a situação apontava para o controlo da doença.

No que respeita à análise da UE4 (exploração VP18D) constituída pela única das explorações bovinas analisadas, que apresenta vocação leiteira e com um regime de produção semi-intensivo, foi possível retirar algumas conclusões preliminares.

O aparecimento dos primeiros 2 casos de seropositividade no efectivo bovino desta exploração em Junho de 2008 verificou-se no mês seguinte à ocorrência dos primeiros ovinos seropositivos no rastreio de Maio de 2008. A suspeita de que os dois eventos deveriam estar relacionados foi confirmada pelos resultados das provas de pesquisa bacteriana onde, a partir de órgãos dos bovinos recolhidos no matadouro e enviados para o LNIV, se obtiveram isolamentos de *Brucella melitensis* biovar 3.

O primeiro isolamento de *B. abortus* biovar 1 ocorreu na sequência do abate do único animal seropositivo detectado no rastreio de Outubro de 2008 e justificou a vacinação deste efectivo bovino com RB51, conforme decisão os serviços veterinários regionais (DSVRALT). Nos isolamentos posteriores efectuados com amostras provenientes dos bovinos seropositivos abatidos em Março de 2009, das 5 amostras recolhidas no matadouro, 2 foram negativas, 2 corresponderam a *B. abortus* biovar 1 e uma ao isolamento de *B. melitensis* biovar 3.

Contrariamente ao referido para as outras UE, nesta exploração, verificou-se um aumento da prevalência de animais seropositivos no último controlo efectuado ao efectivo bovino no período analisado. No entanto, uma vez que a vacinação apenas decorreu em Fevereiro de 2009 é precoce retirar qualquer tipo de conclusão em termos da eficiência ou fracasso da inclusão desta exploração no programa de vacinação com RB51. Sabe-se, no entanto, que a vacina não confere imunidade cruzada contra as restantes espécies do género *Brucella spp* e não apresenta resultados satisfatórios quando utilizada em efectivos infectados

concomitantemente com outras espécies de *Brucella spp* além de *B. abortus* (Schurig *et al.*, 1991).

Em relação às provas de pesquisa bacteriana realizadas no LNIV, foi possível retirar várias conclusões. Em primeiro lugar deve-se salientar o facto de todas as tentativas de isolamento de bactérias do género *Brucella spp* descritas neste estudo, terem sido praticadas em amostras provenientes de órgãos recolhidos no matadouro, em exames *post mortem*, efectuados aos animais seropositivos enviados para abate sanitário. Esta situação deveu-se ao facto de não terem sido enviados para laboratório amostras provenientes de abortos, devido à provável sub-notificação por parte dos proprietários. Esta situação reveste-se de uma importância acrescida, vulgarmente subvalorizada pelos produtores, dado que o aborto tardio é frequentemente o primeiro e único sinal clínico detectável nos bovinos brucélicos. A notificação dos abortos é ainda mais importante nos efectivos não infectados pois estes apenas são controlados serologicamente, por rotina, uma vez por ano, sendo a presença de um surto de abortos numa exploração bovina um indicador chave na detecção precoce de novos focos ou suspeitas de BB. O papel do MVA nestas situações reveste-se de uma importância extrema no que respeita à sensibilização do produtor, não só pela obrigatoriedade legal da notificação dos abortos, mas também para o risco acrescido da persistência dos abortos nas pastagens e instalações, maximizando a infecção do efectivo, como consequência da grande quantidade de agente excretado para o meio ambiente. O papel do MVA é igualmente fundamental na formação dos trabalhadores da exploração no sentido de alertar para os riscos de infecção zoonótica implicados na manipulação, sem protecção, dos produtos do parto e abortos.

No que respeita à taxa de isolamento de bactérias do género *Brucella spp*, esta foi de 61%, uma vez que das 59 amostras recolhidas se obtiveram resultados positivos em 36. Destas, pelo menos 69% corresponderam a isolamentos de *Brucella abortus* biovar 1. Este foi um valor mínimo, uma vez que em 11,8% das amostras (ou seja, 7 das amostras) não foi caracterizado o biovar, apesar de estes isolamentos corresponderem à espécie *B. abortus*.

Apenas nas amostras provenientes de bovinos da UE1, mais concretamente, das explorações VU58F e VU71A houve isolamento de *B. abortus* biovar 3, num total de 4 amostras (duas de cada exploração), o que correspondeu a 11,1% do total dos isolamentos com tipificação da biovar.

Foram isoladas bactérias da espécie *B. melitensis*, num total de 5 das 11 amostras amostras provenientes de bovinos da UE4 (exploração VP18D). Relativamente a esta UE, houve ainda isolamento de *B. abortus* biovar 1 em 3 das 11 amostras enviadas ao LNIV.

Uma das questões preocupantes que se levantaram pela análise dos resultados das provas bacteriológicas, nos casos em que foi possível obter este tipo de informação, consistiu no desfaseamento de datas entre a data de colheita das amostras no matadouro e a data de entrada das amostras no LNIV, apresentando frequentemente períodos superiores a um

mês. Também o período decorrido entre as datas de entrada das amostras no LNIV e as datas de emissão dos resultados apresentam uma duração demasiado longa, ultrapassando muitas vezes os 2 meses. Esta situação não pode ser justificada apenas pela elevada dificuldade de isolamento do agente e pelo seu crescimento fastidioso, uma vez que mesmo para os isolados de *B. abortus* biovar 2, referenciados como os que apresentam uma maior dificuldade de isolamento primário *in vitro*, o período de crescimento primário não ultrapassa os 8 a 10 dias. Para os restantes biovars de *B. abortus* são normalmente necessários apenas 3 a 4 dias para o isolamento primário (OIE, 2009).

Os dados dos isolamentos mais recentes mostram uma tendência de melhoria, com redução destes períodos, mas a situação encontra-se ainda longe da celeridade desejável.

A respeito dos abates sanitários parciais praticados na sequência de seropositividade, importa salientar que a legislação nacional aponta para um período máximo de 30 dias de permanência dos seropositivos na exploração de origem, a contar a partir da data de notificação do detentor.

A celeridade no isolamento e abate dos animais seropositivos está referenciada como um factor chave na prevenção da transmissão de BB no efectivo coabitante. No entanto, apesar de os abates sanitários de bovinos se efectuarem num matadouro na região oeste do país, foi verificado pelo autor que, no caso da DIV de Elvas, este processo de identificação dos animais seropositivos, isolamento do restante efectivo e envio para abate apresentava um período de execução médio de 15 a 20 dias na sua totalidade. Este dado não é oficial, uma vez que não existem registos deste tipo de informações naquela divisão e resulta exclusivamente da percepção do autor que acompanhou de perto todas as ocorrências relacionadas com brucelose, quer bovina, quer dos pequenos ruminantes, no período de estágio curricular decorrido na DIV de Elvas. Esta situação revela uma melhoria na eficiência dos serviços oficiais, uma vez que pela comparação das datas dos rastreios serológicos (detecção) com as datas das colheitas no matadouro (abate) das explorações analisadas, verificou-se que, no passado, nem sempre se cumpriu o prazo limite estipulado na eliminação dos animais seropositivos.

Em relação ao protocolo vacinal instituído, a primovacinação dos animais presentes nas primeiras 6 explorações incluídas no programa, decorreu no período compreendido entre 3 de Setembro e 5 de Dezembro de 2008. Convém porém referir que, para estas explorações, a taxa de cobertura vacinal no final do primeiro mês, tinha atingido já os 95,4% (correspondentes a 1718 animais vacinados de um total de 1801). Na exploração da UE4 a primovacinação decorreu no dia 11 de Fevereiro de 2009.

A selecção dos animais a serem revacinados foi feita pelos serviços oficiais (DSVRALT) à semelhança do instituído no programa de vacinação com RB51 em vigor na região autónoma dos Açores, onde a revacinação das fêmeas jovens estava preconizada apenas para as explorações onde a prevalência de BB não excedesse os 10%, em contraponto às

explorações que excedessem esta taxa e nas quais a revacinação seria realizada em todo o efectivo reprodutor feminino, situação não encontrada em nenhuma das explorações analisadas (Martins, Garin-Bastuji, Lima, Flor, Pina Fonseca, & Boinas, 2009).

A revacinação das fêmeas jovens (animais que tinham, à data da primovacinação, idades compreendidas entre os 4 e os 12 meses) foi realizada, no período reportado, em apenas 3,25% do efectivo bovino das 7 explorações, o que corresponde a 36,1% das fêmeas jovens presentes à data da primovacinação (Tabela 7). É de salientar, no entanto, que esta percentagem de novilhas revacinadas não inclui dados relativos às explorações da UE2 e da UE4, uma vez que não foi possível obter os dados relativos ao número de animais jovens presentes nestas unidades quando foi realizada a primovacinação destes efectivos.

Outra questão relevante a respeito da imunização de efectivos animais na região analisada prendeu-se com o início da vacinação dos pequenos ruminantes com a vacina Rev1, no início de 2009. Este programa de vacinação surgiu com o objectivo, por parte dos serviços veterinários oficiais da região (DSVRALT), de controlar a disseminação da brucelose dos pequenos ruminantes nos concelhos de Estremoz, Fronteira e Sousel, onde a sua prevalência começava a aumentar.

O programa consistiu na aplicação intraconjuntival da vacina em todas as fêmeas com idades compreendidas entre os 3 e os 6 meses de idade, pelos MVA de cada uma das explorações e identificação dos animais vacinados com marcas auriculares normalizadas (redondas e de cor verde).

Quando da execução de IE em situações de suspeita ou de focos de brucelose dos pequenos ruminantes no período de estágio curricular na DIV de Elvas o autor constatou que a prevalência de casos humanos de brucelose entre os detentores de rebanhos infectados (ou seropositivos) apresentava proporções alarmantes. Nos cerca de 50 inquiridos foram identificados mais de 20 casos nos concelhos de Estremoz e Sousel, constituindo a freguesia do Cano (concelho de Sousel) uma situação particularmente grave, onde todos os 7 detentores de ovinos inquiridos já haviam sido infectados com brucelose, na maioria dos casos, com os episódios agudos ocorridos na segunda metade da década de 90. Não foi no entanto possível cruzar esta informação com dados oficiais da Direcção Geral de Saúde (DGS).

6. CONCLUSÕES

A presente avaliação epidemiológica de 7 estudos de caso permitiu uma reflexão aprofundada em relação à BB no Alentejo, uma região com uma elevada importância na produção animal, fundamentalmente no que respeita aos efectivos bovinos que representam, nos anos mais recentes, cerca de metade do efectivo bovino nacional (Tabela 2, pág. 8).

A recente implementação do programa de vacinação com a vacina viva atenuada RB51 na região não permitiu tirar conclusões acerca da influência da vacinação na evolução serológica de BB nos efectivos analisados. No entanto, a avaliação dos factores de risco para a transmissão da doença, bem como a identificação de alguns pontos críticos que poderiam levar ao fracasso ou sucesso do referido programa foram, por si só, relevantes.

Pessoalmente, foram várias as mais valias retiradas da elaboração deste estudo, de entre elas gostaria de destacar, fundamentalmente, o reconhecimento dos métodos e processos de trabalho dos serviços veterinários regionais, a aquisição de valências nos diversos ramos de acção dos MV oficiais a nível local ou regional, mas também os conhecimentos adquiridos em relação à selecção e análise de dados epidemiologicamente relevantes, bem como de metodologias de compilação (BD) ou análise geo-espacial (SIG) dos mesmos dados.

Em relação aos pontos negativos encontrados durante a elaboração deste trabalho destacaram-se:

- A impossibilidade de utilizar os dados do “parcelário” (efectuado pelo INGA e que contem os mapas pormenorizados de todas as explorações agrícolas e pecuárias do território nacional) que não permitiu uma análise mais completa e rigorosa das relações geo-espaciais, não só das explorações afectadas, como de todas as explorações confinantes. Incompreensivelmente, uma vez que estamos perante dois organismos do Estado Português, estes dados não são disponibilizados à DGV para análises epidemiológicas de surtos de doenças ou de novos focos de doenças infecciosas e análise do risco de dispersão das mesmas;
- A existência de dois programas informáticos distintos para gestão das informações sanitárias (*PISA.net*TM) e dos registos da movimentação animal (SNIRA) complicam grandemente a avaliação epidemiológica da origem da infecção uma vez que, para um mesmo animal, é necessário consultar duas BD distintas;
- A falta de registos electrónicos (BD), por parte da DGV e departamentos regionais, de algumas das informações dos IE relativamente à epidemiovigilância de doenças e que apenas se encontram em formato físico e de difícil acesso nos arquivos das DSVR e DIV;

- A inexistência de caracterização molecular (“bruces”) dos isolados obtidos nas provas bacterianas constitui uma barreira a uma mais eficiente ferramenta para a avaliação epidemiológica dos focos de BB, tanto na identificação da origem da infecção nos novos casos, como na avaliação da progressão da infecção num determinado efectivo ou região, uma vez que a simples tipificação em termos de biovar não permite o estabelecimento deste tipo de avaliações mais precisas;
- A dificuldade na obtenção de dados epidemiológicos por parte da DGS em relação aos casos de brucelose humana em Portugal, o que se revela particularmente incompreensível uma vez que esta se trata de uma doença com uma enorme importância no âmbito da Saúde Pública. Outra questão relevante a este nível prende-se, fundamentalmente, com a fraca intercomunicabilidade de informações entre as autoridades sanitárias veterinária e humana, o que contraria o lema actual de “Uma Só Saúde”, preconizado pelas entidades oficiais nacionais e comunitárias.

No que respeita a questões relevantes, relativas à problemática da brucelose na região analisada, considero que seria relevante, no futuro:

- Avaliar a situação epidemiológica da brucelose dos pequenos ruminantes nesta região, uma vez que se iniciou uma campanha de vacinação intraconjuntival das fêmeas entre os 3 e os 6 meses de idade, com *Rev1*, nos concelhos de Estremoz, Sousel e Fronteira no início de 2009. Este programa foi implementado pela emergência da doença nos pequenos ruminantes da região;
- Avaliar a importância dos vectores mecânicos na transmissão de brucelose, uma vez que, tanto para os produtores pecuários como para MVA da região que foram interrogados pelo autor, o papel dos animais silvestres na disseminação do agente é frequentemente menosprezado e carece de uma avaliação mais cuidada;
- Realizar avaliações epidemiológicas destes e de outros PIS durante os primeiros 5 anos do programa para uma correcta interpretação dos dados e auxílio na tomada de decisão na continuação ou interrupção da vacinação destas unidades epidemiológicas, por parte das autoridades competentes e eventual extrapolação para os PIS que venha eventualmente a ser protocolados no futuro.

7. BIBLIOGRAFIA


- Aitken, I. D. (2007). *Diseases of Sheep* (4 ed.). Backwell Publishing.
- Berkow, R., Beers, M. H., & Fletcher, A. J. (1997). *Manual Merck de Saúde para a Família*. Merck, Sharp & Dohme.
- Biancifiori, F., Garrido, F., Nielsen, K., Moscati, L., Duran, M., & Gall, D. (2000). Assesment of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) for diagnosis of brucellosis in infected and Rev. 1 vaccinated sheep and goats. *New Microbiologica* , 23, 399-406.
- Cloeckaert, A., Jacques, I., & Grilló, M. J. (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev-1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* , 2827-2835.
- Cloeckaert, A., Verger, J. M., Granyon, M., & Grepinet, O. (1995). Restriction site polymorphism of genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology* , 141, 2111-2121.
- Coetzer, J. A., & Tustin, R. C. (2004). *Infectious Diseases of Livestock* (Vol. 3). Oxford University Press Southern Africa.
- Corbel, M. J. (1997). Recent advances in brucellosis. *J. Med. Microbiol.* , 46 , 101-103.
- Crasta, O. R., Folkerts, O., Zhangjun, F., Mane, S. P., Evans, C., Martino-Catt, S., et al. (2008). Genome Sequence of *Brucella abortus* Vaccine Strain S19 Compared to Virulent Strains Yields Candidate Virulence Genes. *Plosone (Open access)* , 3 (5).
- Crawford, R. P., Huber, J. D., & Adams, L. G. (1990). Epidemiology and surveillance. In K. Nielsen, & B. Duncan, *Animal brucellosis* (pp. 131-151). Orlando: CRC Press.
- D'Anastasio, R., Zipfel, B., Moggi-Cecchi, J., Stanyon, R., & Capasso, L. (2009). Possible Brucellosis in an Early Hominin Skeleton from Sterkfontein, South Africa. *PLoS ONE* 4(7): e6439 .
- DGV. (2009). *Manual de Apoio à Implementação dos Testes de Pré-Movimentação (no Âmbito dos Programas de Erradicação da Tuberculose e Brucelose Bovina)*. Lisboa: Direcção Geral de Veterinária.
- DGV. (2010). *Programa de Erradicação da Brucelose dos Bovinos 2010 - Portugal*. Direcção Geral de Veterinária. Lisboa: Direcção Geral de Veterinária.
- DGV. (2010). *Relatórios Técnicos Anuais para 2009 sobre os Programas de Erradicação da Tuberculose dos Bovinos, Brucelose dos Bovinos, Leucose Enzoótica dos Bovinos e Brucelose dos Pequenos Ruminantes*. Direcção Geral de Veterinária, Lisboa.
- DSVRALT. (2008). *Brucelose Bovina - Programa Especial de Erradicação para a Região do Alentejo para 2009*. Direcção Geral de Veterinária - Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo.
- FAO/WHO. (1986). *Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis*. Geneva: World Health Organization Technical Report Series.
- Ferreira, A. J., & Ferreira, C. (1990). *Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos* (4ª ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., & Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* , 57, 2688-2693.
- Grilló, M. J., Barberán, M., & Blasco, J. M. (1997). Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *The Veterinary Record* , 140, 602-605.
- Gyles, C. L., Prescott, J. F., Songer, J. G., & Thoen, C. O. (2004). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (3 ed.). Blackwell Publishing.
- Herrera-López, E., Suárez-Güemes, F., Hernández-Andrade, L., Córdova-López, D., & Díaz-Aparicio, E. (2010). Epidemiological study of Brucellosis in cattle, immunized with *Brucella abortus* RB51 vaccine in endemic zones. *Vaccine* , 28S, F59–F63.
- Hirsh, D. C., & Zee, Y. C. (1999). *Veterinary Microbiology*. USA: Blackwall Science.
- Hugh-Jones, M. E., Hubbert, W. T., & Hagstad, H. V. (1995). *Zoonoses: Recognition, Control and Prevention*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.
- Kahn, C. M., & Line, S. (2005). *The Merck Veterinary Manual*. N.J. , U.S.A.: Merck & Co., Inc.
- Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., et al. (2006). Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology* .
- Lütticken, D., Segers, R. P., & Visser, N. (2007). Veterinary vaccines for public health and prevention of viral and bacterial zoonotic diseases. *Rev. scie. tech. Off. int. Epiz.* , 165-177.
- Martins, H., Garin-Bastuji, B., Lima, F., Flor, L., Pina Fonseca, A., & Boinas, F. (2009). Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal—Outcome of a 5-year programme (2002–2007) based on test-and-slaughter and RB51 vaccination. *Preventive Veterinary Medicine* , 90, 80-89.
- Molello, J. A., Flint, J. C., Collier, J. R., & Jensen, R. (1963). Placental pathology. II. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *American Journal of Veterinary Research* , 24, 422-429.
- Moreno, E. (1984). Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* , 43, 779.
- Nicoletti, P. (2002). A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology* , 90, 5-9.
- Nicoletti, P. (1980). The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* , 24, 69-98.
- OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (6^a ed., Vol. 2). (2009). Paris, France: Office International des Epizooties.
- Olsen, S. C., Stevens, M. G., Cheville, N. F., & Schurig, G. (1997). Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diagn. Invest.* , 9, 363-367.
- Parascandola, J. (1998). Alice Evans, An Early Woman Scientist at NIH. *Public Health Reports* , 1/3.

- Paulin, L. M. (2006). *Brucelosis en animales de América del Sur. Estrategias de control*. (Vol. 3). (J. C. Abuin, R. A. Cachione, R. Durlach, O. P. Larghi, & P. Martino, Edits.) Asociación Argentina de Zoonosis.
- Poester, F. P., Ramos, E. T., Gomes, M. J., Chiminazzo, C., & Schurig, G. (2000). The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* , 37 (1).
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Publishing .
- Radostitis, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). *Veterinary Medicine*. Saunders Elsevier.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2000). *Veterinary Medicine - A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses* (9ª ed.). Londres: W. B. Saunders.
- Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., & Oñate, A. (2006). *Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids. *Arch. Med. Vet.* , 38 (1), 7-18.
- Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., et al. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* , 60 ((Pt 4)).
- Schurig, G. G., Roop II, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D., & Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* , 28, 171-188.
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N., & Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* , 90, 479-496.
- Serafino, J., Conde, S., Zabala, O., & Samartino, L. (2007). Multiplicación de *Brucella abortus* y producción de óxido nítrico en dos líneas celulares de macrófagos de distinto origen. *Revista Argentina de Microbiología* , 193-198.
- Sözmen M., S. D. (2004). Immunohistochemical and Microbiological Detection of *Brucella Abortus* Antigens in Aborted Bovine Fetuses. *Acta Vet. Brno* , 465-472.
- Stoffregen, W. C., Olsen, S. C., Wheeler, C. J., Bricker, B. J., Palmer, M. V., Jensen, A. E., et al. (2007). Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. *J Vet Diagn Invest* (19), 227-237.
- Straw, B. E., Zimmerman, J. J., D'Allaire, S., & Taylor, D. J. (2006). *Diseases of Swine* (9 ed.). Blackwell Publishing.
- Taylor, A. W., & Macdiarmid, A. (1949). *The stability of the avirulent characters of Brucella abortus strain 19 and 45/20 in lactating and pregnant cows*. In: Coetzer, J. A. W.; Tustin, R. C.; *Infectious Diseases of Livestock* (2004), Oxford University Press Southern Africa.
- Taylor, D. J. (1983). *Pig Diseases*. Cambridge: The Burlington Press.
- Villarroel, M., Grell, M., & Saenz, R. (2000). Reporte de primer caso humano de aislamiento y tipificación de *Brucella abortus* RB 51. *Arch. med. vet. v.32 n.1 Valdivia* .
- Wyatt, H. V. (1999). *Royal Navy Surgeons and the transmission of brucellosis by goats milk*. R. Navy Med. Serv.

ANEXOS

Anexo 1 – Modelo de Inquérito Epidemiológico utilizado



Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas

DAV
Direcção-Geral
da Veterinária

BRUCELOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE I

Explorações Bovinas com Animais Sero-Positivos / Focos de Brucelose

Objectivo: Caracterização da exploração, avaliação da origem da infecção e avaliação da sua possível difusão para outras explorações.

1- Caracterização da Exploração e Assistência Veterinária

1.1. Marca Oficial de Exploração (MOE) _____

Detentor: _____ Telefone/Telemóvel: _____

Local _____

Localidade/Freguesia _____ Concelho: _____

OPP _____ Não aderente a OPP ☐

Geo-referenciação (facultativa): Latitude _____ Longitude _____

1.2. Efectivo da exploração (c/base no SIRA/RED):

Fêmeas Adultas _____ Fêmeas de substituição _____ Machos reprodutores _____ Engorda _____

Outros ruminantes ☐ Indique espécie(s) _____ e nº _____

1.3. Assistência Veterinária – Médico Veterinário Executor:

Nome _____

Cédula Profissional nº _____ Contacto telefónico _____

2 – Caracterização sanitária

2.1. Classificação Sanitária B _____

Datas e resultados de todos os rastreios dos últimos 3 anos (**Anexo 1** - listagem do PISA)

2.2. Vacinação para Brucelose: **Anexo 2** - listagem do PISA

Tipo de vacina utilizada: _____

Data: início _____ / _____ / _____ Última vacinação _____ / _____ / _____

Jovens/Adultos: _____ / _____ Taxa de cobertura: _____ % / _____ %

2.3. Abortos:

Ocorrência de abortos ☐

Meses da gestação: _____ Nº de abortos nos últimos 12 meses _____

Recolha e envio para análise laboratorial ☐

Data(s) de colheita _____ Número abortos enviados _____

Outras patologias que causem abortos diagnosticadas na exploração ☐

Caracterização e datas _____

2.4. Problemas de fertilidade das fêmeas reprodutoras ou de mortalidade neonatal ☐

Caracterização e datas _____

2.5. Observações:

DOCUMENTO DE TRABALHO

1

LARGO DA ACADEMIA NACIONAL DE BELAS ARTES, 2 – 1249-105 LISBOA TEL/FX: 21 323 95 90 FAX: 21 346 35 18



3- Origem e difusão da Infecção (*dados dos últimos 12 meses)

3.1. Contactos directos com ruminantes de outras explorações * ☐

Caracterização das explorações: Ovinos e Caprinos ☐ Bovinos ☐
Data(s) _____ MOE(s): _____ Classificação(ões) sanitária(s): _____
Tempo de contacto: acidental ☐ pouco frequente ☐ frequente ☐
vedações ☐ transumância ☐ pastos comuns ☐ caminhos partilhados ☐
Animais silváticos: ☐ Espécie(s) _____

3.2. Contacto com explorações de ruminantes do mesmo proprietário ☐

MOE (s) _____ (**Anexo 3** - listagem do PISA/SNIRA com dados sobre espécies de animais, exploração (ões) – espécie(s), nº animais, localização)

3.3. Introdução de animais * ☐

Explorações ☐ MOE(s) _____ Centros de Agrupamento ☐ MOE(s) _____
Empréstimo ☐ tempo de permanência _____
Nº animais, idades, MOE de origem, classificação sanitária (**Anexo 4** - listagem SNIRA)

3.4. Identificação do Transportador habitual _____

3.5. Testes de pré-movimentação de animais introduzidos * ☐ (**Anexo 5** – resultados)

Resultados _____ Data(s) colheita _____ Data(s) de análise _____

3.6. Utilização de macho(s) reprodutor(es) * ☐

Própria exploração ☐ Exterior à exploração ☐ I.A. ☐
MOE(s) de Origem _____ Classificação(ões) sanitária(s) B _____

3.7. Partilha de equipamentos/ alfaia com outras explorações * ☐

MOE(s) de Origem _____ Classificação(ões) sanitária(s) B _____

3.8. Casos de Brucelose nos últimos 5 anos ☐ (Se sim, **Anexo 6** – listagem do PISA)

3.9. História prévia de Brucelose na Exploração

3.10. Opiniões do proprietário sobre a origem provável da doença

Introdução de animais ☐ Vizinhança ☐ Re-ocorrência ☐
Transumância /mistura de animais/pastagens comuns ☐ Outras causas ☐ _____

3.11. Opiniões do veterinário executor sobre a origem provável da doença

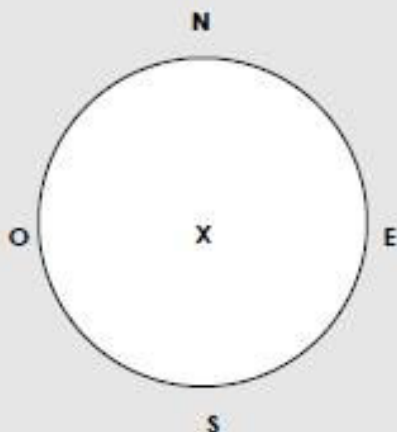
Introdução de animais ☐ Vizinhança ☐ Re-ocorrência ☐
Transumância/mistura de animais/pastagens comuns ☐ Outras causas ☐

3.12. Saída de animais da exploração * ☐

Caracterização das explorações de destino: Ovinos e Caprinos ☐ Bovinos ☐
MOE(s): _____ Classificação(ões) sanitária(s): _____
Centros de agrupamento ☐ Saída de produtos / estrume da exploração ☐



3.13. Esquema das explorações confinantes geograficamente, MOE e classificações sanitárias das explorações envolventes



3.14. Observações

3.15. Provável origem da infeção:

Data ____/____/____

Relator _____

Informações prestadas pelo detentor da exploração ☐

Se não, identificar função/ grau parentesco _____



BRUCELOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE II

Explorações Bovinas com Animais Sero-Positivos / Focos de Brucelose

Objectivo: informações que permitem avaliar a difusão da doença na exploração e programar estratégias de controlo para redução da sua difusão na própria exploração e para outras.

1. Caracterização da exploração e do sistema produtivo

1.1. Aptidão Produtiva

Leite ☐ Carne ☐ Outra ☐
Intensivo ☐ semi-intensivo ☐ extensivo ☐

1.2. Regime da exploração

Estabulação ☐ Pastoreio ☐ Misto ☐ % Pastoreio _____

Animais por hectare

1.3. Prática transumância/pastoreio comum ☐ Caracterize

1.4. Finalidade produtiva dos animais adquiridos

Reprodução ☐ Produção leite/carne ☐ Engorda ☐ Outras ☐

1.5. Reposição do efectivo reprodutor (fêmeas):

Auto-reposição ☐ Compra no exterior ☐ Gestantes ☐

1.6. Avaliação dos possíveis pontos de contacto com animais de outras explorações (em todo o perímetro da exploração):

1.7. Condições para isolamento dos animais ☐

1.8. Partos:

Sazonais ☐ Cuidados na assistência aos partos ☐
Isolamento das fêmeas ☐ Destino das secundinas/abortos:

1.9. Maneio em Grupos Produtivos ☐ Elários ☐

1.10. Higiene da exploração

Limpeza e desinfecção ☐ Periodicidade _____ Destino do estrume? _____

Apreciação das condições de higiene da exploração: Boas ☐ Suficientes ☐ Más ☐

1.11. Cães

Colheita sangue ☐ Resultado _____ tratamento _____

1.12. Zoonose

Brucelose Humana ☐ Venda de produtos e processamento ☐

1.13. Recomendações de medidas de controlo:



BRUCELOSE BOVINA - INQUÉRITO – PARTE III
Explorações Bovinas com Animais Sero-Positivos / Focos de Brucelose

1. Explorações epidemiologicamente ligadas

1.1. Dados das explorações / Número de animais / Classificação sanitária

MOE

MOE

MOE

1.2. Caracterização das explorações

MOE

MOE

MOE

1.3. Ocorrência de abortos

MOE

MOE

MOE

1.4. Resultados Laboratoriais (Serologia positiva/Isolamento/ Biovar)

MOE

MOE

MOE

1.5. Observações



ANEXOS

Anexo 1 □

Listagem do PISA c/ datas e resultados de todos os rastreios dos últimos 3 anos

Anexo 2 □

Listagem de todos os animais vacinados na exploração

Anexo 3 □

Listagem do PISA/SNIRA com dados sobre espécies animais, nº animais, localização de explorações de ruminantes do mesmo proprietário

Anexo 4 □

Listagem dos dados dos animais introduzidos na exploração nos últimos 12 meses (número, idades), com identificação da MOE de origem e respectiva classificação sanitária)

Anexo 5 □

Listagem dos testes de pré-movimentação de animais introduzidos nos últimos 12 meses ou cópia dos boletins de análise com o respectivo resultado

Anexo 6 □

Listagem do histórico das classificações sanitárias dos últimos 5 anos